

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИРКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ И
ТРАВМАТОЛОГИИ»**

На правах рукописи

**ЗЕЛЕНИН
Николай Вадимович**

**УПРАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССОМ ЗАЖИВЛЕНИЯ ХИРУРГИЧЕСКОЙ РАНЫ
ПУТЁМ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ P38 МАРК КАСКАДА**

14.01.31 – пластическая хирургия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Н.Е. Мантурова

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор РАН
И.А. Шурыгина

Иркутск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 УПРАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССОМ ЗАЖИВЛЕНИЯ ХИРУРГИЧЕСКОЙ РАНЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	10
1.1 Современные принципы лечения ран	10
1.2 Фазы заживления раны. Факторы, влияющие на заживление раны	13
1.3 Митогенактивируемые протеинкиназы. Влияние p38 MAP-киназы на развитие соединительной ткани	17
1.4 Использование блокаторов p38 MAP-киназ	22
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ	25
2.1 Моделирование кожно-мышечной раны	25
2.2 Определение механических характеристик сформированного рубца на модели кожно-мышечной раны	27
2.3 Морфологические и морфометрические исследования	28
2.4 Иммуногистохимические и иммунофлюоресцентные исследования	29
2.5 Электронно-микроскопические исследования	32
2.6 Методы статистического анализа	32
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	33
3.1 Особенности формирования послеоперационного рубца в условиях локального подавления активности p38 MAP-киназы при заживлении кожно-мышечной раны	33
3.2 Механическая прочность послеоперационного рубца при подавлении активности p38 MAP-киназы	44
3.3 Оценка синтеза коллагена при формировании послеоперационного рубца на фоне снижения активности p38 MAP-киназы	48

3.4 Влияние блокатора p38 MAP-киназы на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца	58
3.5 Изучение ультраструктуры клеток фибробластического ряда при подавлении активности p38 MAP-киназы	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
ВЫВОДЫ	86
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	87
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	89

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Можно без преувеличения сказать, что знания о заживлении ран относятся к фундаментальным знаниям медицины и пластической хирургии, в частности.

Jeffrey E. Janis и Bridget Harrison считают, что успех развития пластической хирургии основан на углублённом понимании одного фундаментального вопроса – заживления раны [117].

Что бы ни было целью пластической хирургии, будь то замещение дефектов тканей лоскутами с осевым кровотоком, реплантация конечности или эндопротезирование груди, выполненное по эстетическим показаниям, исход операции зависит от заживления разрезов без осложнений [117]. С другой стороны, лечение уже возникших осложнений требует новых данных о механизмах очищения ран, роли биомаркеров в прогнозе и выборе тактики лечения [59], стволовых клетках и их роли в регенерации тканей [177], раневой инфекции и развитии биофильма вокруг имплантатов [98].

Пока остаётся мечтой создание таких условий для заживления раны, чтобы она заживала совсем без образования рубца или чтобы такой рубец формировался бы с заданными свойствами.

Понятно, что решение таких задач требует совместных усилий пластических хирургов и учёных самых различных специальностей, а также огромных финансовых затрат [115, 153].

Тем не менее, становится очевидным, что одно только совершенствование хирургической техники не приведёт исчезновению проблемы заметных рубцов, и для качественного скачка нужны новые фундаментальные знания о механизмах воспаления и формирования соединительной ткани.

В современном понимании заживление раны представляет собой сложно регулируемый процесс, состоящий из многочисленных последовательно проходящих реакций между клетками и формирующимся внеклеточным матриксом. Этот процесс регулируется хемоаттрактантами и митогенами,

а многочисленные факторы роста дают клеточные и молекулярные сигналы, необходимые для нормального заживления раны [62, 75, 76, 79, 194].

Исследования, выполненные *in vitro*, приводят к значительному накоплению наших знаний по этому вопросу, однако в практической медицине по-прежнему отсутствуют лекарственные препараты, которые препятствовали бы чрезмерному развитию рубцовой ткани [38, 53, 60, 74, 111, 135, 137, 144, 148, 158].

Открытие митоген-активируемых протеинкиназ (mitogen activated protein kinases, MAPK) позволило подойти к возможности управления процессом заживления послеоперационной раны с новых позиций, так как дальнейшее изучение протеинкиназ, которые активируются митогенами, показало, что они участвуют в регуляции клеточной активности (экспрессия генов, митоз, дифференциация, выживание клеток, апоптоз). В настоящее время механизм с участием MAP-киназ представляется следующим образом. Воздействие на рецепторы мембраны клетки приводит к развитию каскадных реакций фосфорилирования MAP-киназ и других регуляторных белков, в результате чего обеспечивается передача полученного сигнала в ядро клетки. Многократно усиленный сигнал приводит к активации или подавлению активности определённых генов, а в результате запускаются воспалительный ответ, апоптоз, деление и дифференциация клеток [31, 84, 106, 134, 141].

Управление активностью MAP-киназ может привести к появлению принципиально новых возможностей для заживления ран и образования соединительной ткани с заданными улучшенными свойствами.

Целью нашего исследования стало изучение возможности управления процессом образования послеоперационного рубца путём снижения активности митоген-активируемой протеинкиназы группы p38.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. На модели хирургической кожно-мышечной раны в условиях эксперимента исследовать закономерности процесса заживления раны при искусственном снижении активности p38 MAPK.

2. В условиях асептической кожно-мышечной раны при искусственном снижении активности p38 MAPK изучить экспрессию маркеров дифференцировки клеток фибробластического ряда и синтетическую активность фибробластов.

3. Определить механические свойства образующегося послеоперационного рубца при уменьшении активности p38 MAPK-каскада.

4. Разработать метод формирования послеоперационного рубца с заданными характеристиками посредством изменения активности p38 MAPK.

Научная новизна

1. Впервые установлено, что снижение активности p38 MAP-киназного каскада в ранние сроки раневого процесса существенно влияет на характеристики образующегося соединительнотканного рубца и существенно изменяет воспалительный процесс.

2. Установлено, что при применении блокатора p38 MAPK снижается выраженность нейтрофильной инфильтрации, модифицируется ответ клеток фибробластического ряда в зоне асептического повреждения.

3. Доказано снижение синтетической активности фибробластов при локальном применении ингибитора p38 MAPK в ранние сроки раневого процесса заживления раны.

4. Впервые показано, что местное использование блокатора p38 MAPK SB 203580 приводит к существенному изменению механических характеристик образующегося рубца на месте асептической кожно-мышечной раны, соответствующей ране при субпекторальном увеличении молочных желез через субмаммарную борозду. Местное действие блокатора p38 позволяет к 30-м суткам после нанесения раны добиться образования рубца, при котором механические свойства кожи в области рубца (разрушающая нагрузка и точка перехода упругой деформации в пластическую) значительно приближаются к показателям интактной кожи, чем в контроле. При этом рубец оказывается более тонким.

Теоретическая и практическая значимость

Установленное значительное влияние блокатора p38 MAPK SB 203580 на механические и косметические характеристики рубца, образующегося после нанесения хирургической кожно-мышечной раны, позволяет разрабатывать новые способы влияния на оптимизацию формирования послеоперационных рубцов.

Разработан и протестирован в эксперименте в условиях асептической раны оригинальный способ интраоперационного однократного введения лекарственного средства с медленным высвобождением действующего вещества в зону репарации. Разработанный способ изменения характеристик послеоперационного рубца под действием p38 MAPK перспективен для дальнейшей трансляции к применению в клинической практике.

Проведённое исследование показало, что существуют хорошие перспективы улучшения качества послеоперационного рубца. Они заключаются в использовании достижений молекулярной медицины – создании новых материалов (лекарственных плёнок, шовного материала) эндопротезов с заданными свойствами – с включением в состав данных материалов блокаторов p38 MAPK.

Данные нашего исследования показывают, что блокатор p38 MAP-киназ SB 203580, который мы помещали внутрь полимерной рассасывающейся плёнки, приводит к неосложнённому заживлению кожно-мышечной раны с образованием статистически значимо более тонкого рубца, чем в контрольных опытах. Это наводит на мысль о том, что возможно создание подобной полимерной рассасывающейся плёнки, покрывающей, например, силиконовые имплантаты для эндопротезирования груди, ягодиц и голеней. Подобные исследования могут иметь очень большое практическое значение для профилактики образования послеоперационных контрактур после различных видов эндопротезирования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Локальное введение блокатора p38 MAP-киназного сигнального каскада на начальном периоде заживления хирургической раны снижает выраженность

нейтрофильной инфильтрации, а с 3-х по 30-е сутки наблюдения статистически значимо уменьшает интенсивность коллагенообразования и повышает фиброкластическую активность в зоне послеоперационного рубца.

2. Разработанный способ локального подавления p38 MAPK приводит к формированию статистически значимо более узкого послеоперационного рубца при сохранении его механической прочности.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на 77-й итоговой научно-практической студенческой конференции СНО им. И.И. Мечникова «Вопросы экспериментальной и клинической медицины» (Иркутск, апрель 2010 г.); OzBio2010 Combined Conference (Melbourne, Australia, September 26 – October 1, 2010); 68-й открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», посвящённой 75-летию ВолГМУ (Волгоград, сентябрь 2010 г.); Международной конференции и Международной школе молодых учёных «Проблемы экологии»: Чтения памяти профессора Михаила Михайловича Кожова (Иркутск, сентябрь 2010 г.); II научно-практической конференции молодых учёных Сибирского и Дальневосточного федерального округов (Иркутск, октябрь 2010 г.); конференции «Генетическая и регенеративная медицина: проблемы и перспективы» (Киев, октябрь 2010 г.), 78-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых учёных СНО им. И.И. Мечникова (Иркутск, апрель 2011 г.), Asian Congress on Biotechnology (Shanghai, China, 11–15 May 2011), конференции молодых учёных ВСНЦ СО РАМН (Иркутск, сентябрь 2011 г.), Юбилейной конференции НЦРВХ СО РАМН (Иркутск, октябрь 2011 г.), XIV Международной молодёжной конференции по люминесценции и лазерной физике (Иркутск, 30 июня – 5 июля 2014 г.), VI международном Live Surgery & Injections Курсе «Продвинутая эстетическая хирургия и медицинская косметология лица, груди и тела. 2018» (Санкт-Петербург

11–14 октября), на VII Национальном конгрессе «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» (Москва, 6–8 декабря 2018 г.)

Апробация диссертационной работы состоялась на совместном заседании научно-лабораторного отдела, научного отдела клинической хирургии и научно-клинического отдела травматологии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (Протокол № 1 от 02.07.2018 г.).

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах и состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей использованные в исследовании материалы и методы, главы собственных наблюдений, заключения, выводов.

Диссертационная работа иллюстрирована 47 рисунками и 4 таблицами. Список литературных источников, использованных при написании диссертации, включает 197 научных работ, 43 отечественных и 154 зарубежных авторов.

Материалы диссертационного исследования автора опубликованы в 21 статье, в том числе 8 статей опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, 3 статьи – в журналах, входящих в Scopus, 1 статья – в журнале, входящем в WoS, 4 статьи – в материалах международных конференций.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта ГК П803 «Изучение роли молекулярных МАР-киназных механизмов в регуляции роста соединительной ткани» в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.».

ГЛАВА 1

УПРАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССОМ ЗАЖИВЛЕНИЯ ХИРУРГИЧЕСКОЙ РАНЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Современные принципы лечения ран

Лечение ран является важнейшим вопросом пластической хирургии и прошло длительный эволюционный путь развития от прижигания раны кипящим маслом и повязок, смоченных вином до современных повязок из синтетических материалов с использованием постоянного вакуумирования или повязок, включающих культуры стволовых клеток и местные факторы роста. Отсутствие возможности наложить швы на рану сменилось современными методами замещения дефектов тканей лоскутами кровоснабжаемых тканей при помощи микрососудистой техники.

На приёме у пластического хирурга пациенты задают два самых популярных вопроса: «останется ли рубец?» и «что можно сделать, чтобы рубец был менее заметным?».

Американский хирург W.S. Halsted в книге «Surgical papers» в начале XX в. предложил принципы успешного заживления ран, которые остаются актуальными и в настоящее время: бережное обращение с тканями во время оперативного вмешательства, асептическая техника, тщательная остановка кровотечения, отсутствие карманов и натяжения при зашивании раны, а также обеспечение ей покоя в послеоперационном периоде.

Эти принципы выполнения операций остаются незыблемыми для любых видов вмешательств, в отношении любых тканей организма.

Ишемия и высушивание тканей приводят к некрозу и формированию недостаточно прочного рубца. Поэтому очень важно избегать грубого обращения с тканями при проведении оперативного вмешательства [196].

Важная роль в заживлении хирургических ран отводится асептической технике [86, 107, 178, 190].

В успешном заживлении хирургической раны большое значение имеет тщательная остановка кровотечения. Скопление крови в ране всегда нарушает нормальный процесс её заживления [196].

Анатомически точное рассечение тканей – ещё один принцип для обеспечения неосложнённого заживления хирургической раны. Разрез является началом любого планового оперативного вмешательства. При выборе линии разреза важно учитывать ход нервных волокон и сосудов. Я. Золтан называл правильно выполненный разрез «физиологическим», подчёркивая, что разрез не должен лишать окружающие ткани адекватного кровоснабжения и иннервации [14].

Разрез должен быть выполнен уверенно и аккуратно. Желательно, чтобы разрез был перпендикулярным к коже и не содержал острых углов. Плохо выполненный разрез может привести к плохому сопоставлению краёв раны и, как следствие, к формированию грубого рубца [196].

Необходимо отметить, что рассечение кожных покровов следует производить также с учётом расположения так называемых линий Лангера [25]. Разрезы кожи, перпендикулярные линиям Лангера, дают худшие в косметическом отношении результаты [27].

Ушивание раны с натяжением вызывает ишемию и некроз тканей, в результате происходит расхождение краёв раны и формируется грубый рубец [66, 126, 149, 196].

Любой разрез, выполненный через всю толщу кожи, у взрослого человека оставляет рубец, который может стать для него не только функциональной, но и большой психологической и эстетической проблемой.

Особое значение проблема образования рубцов имеет в практике пластического хирурга, где качество результата операции во многом определяется качеством послеоперационных рубцов [5, 16, 19, 21, 38].

Для уменьшения заметности рубцов хирурги стремятся располагать их в скрытых областях, для уменьшения длины рубца используют при зашивании раны различные специальные приёмы и при необходимости назначают

послеоперационное лечение, направленное на улучшение качественных характеристик рубца [4, 5, 14, 21, 28, 38, 42].

Внимание к деталям при выполнении операции и зашивании раны является важнейшим условием образования качественного рубца [4, 7, 34, 36, 37].

Для закрытия раны в пластической хирургии известен такой механизм принятия решения, как «реконструктивная лестница». Суть этого алгоритма состоит в последовательном анализе пластическим хирургом альтернатив для лечения раны [65].

Рана может быть оставлена без какого-либо хирургического вмешательства, и её лечение осуществляется посредством перевязок, либо лечение раны осуществляется под отрицательным давлением, что оказывается значительно более комфортным для пациента, чем лечение раны под влажно-высыхающими повязками [72].

Другим важным дополнением для консервативного лечения ран является использование стволовых клеток. Лечение стволовыми клетками производится при помощи повязок «Apligraf», «Dermagraft», содержащих фибробласты плода на коллагене или биорастворимом полигалактине. Эти повязки показали неплохую эффективность для лечения длительно не заживающих ран [102, 166, 167]. Однако остаются два ключевых вопроса, нуждающиеся в ответах: во-первых, какая из популяций стволовых клеток является лучшей для лечения ран в плане скорейшего заживления раны и образования минимального рубца; во-вторых, каким образом лучше доставлять стволовые клетки в рану [177].

Решение о необходимости использования того или иного способа хирургического лечения раны также принимается последовательно. Рана может быть зашита, закрыта кожным трансплантатом, либо для её закрытия применяются манёвры с местными тканями, такие, как встречные треугольные лоскуты, ромбовидный лоскут Лимберга, V-Y пластика.

Следующими по сложности идут операции по замещению дефектов тканей с выкраиванием ротационных лоскутов с осевым кровотоком и, наконец,

использование для этой цели аутотрансплантации микрососудистых лоскутов [8, 13, 22, 24, 65].

Решение о выборе метода лечения принимается хирургом на основе как местной ситуации в ране, так и общего состояния пациента. При этом во внимание принимаются такие факторы, как возраст, состояние метаболизма и белкового обмена, наличие эндокринных нарушений и проведение лечения с использованием радиоактивного облучения, химиотерапии [65].

1.2 Фазы заживления раны.

Факторы, влияющие на заживление раны

Процесс заживления раны принято делить на три фазы: воспаление, пролиферация, созревание и ремоделирование рубца [121, 129, 163, 169].

Хотя процессы переходят из одной фазы в другую, такое деление позволяет сделать описание целого более простым. Каждая из фаз заживления раны является критической для общего процесса, и изменения в ней могут приводить к задержке закрытия раны и превращения её в хроническую язву [193].

Разрушение стенки кровеносного сосуда приводит к выходу форменных элементов крови в межтканевую жидкость, активации тромбоцитов, образованию сгустка крови, агрегации и активации продуктов метаболизма, которые в последующем приводят к активации факторов роста, развитию тканевого матрикса, хемотаксису, эпителизации и ангиогенезу.

Нейтрофилы прибывают к месту повреждения в течение первых двух суток, однако их роль в заживлении раны не является обязательной, так как цитокины, выделяемые нейтрофилами, являются необязательными для заживления раны или могут быть выделены другими клетками [85].

Фактически активация нейтрофилов приводит к освобождению свободных радикалов и других цитокинов, характерных для замедленного заживления хронической раны [128].

В отличие от нейтрофилов, миграция в рану моноцитов, которые быстро превращаются в тканевые макрофаги, считается обязательным для неосложнённого заживления раны [124], поскольку показано, что введение антимакрофагальной сыворотки замедляет очищение раны и апоптоз нейтрофилов, что создаёт условия для поддержания воспаления и превращения раны в хроническую [48].

Стадия пролиферации – это большая группа важных процессов, которые начинаются в различное время: таких, как эпителизация, ангиогенез, формирование грануляционной ткани и накопление коллагена. Эпителизация происходит за счёт митоза кератиноцитов по краям раны, волосяных фолликулов и сальных желёз. На стадии пролиферации важная роль принадлежит эпидермальному фактору роста, фактору роста фибробластов, трансформирующему фактору роста бета и многочисленным цитокинам.

Ангиогенез, который является критически важным для заживления раны, инициируется и поддерживается фактором роста фибробластов, тромбоцитарным фактором роста, вазоэндотелиальным фактором роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) [2, 26, 39].

Ангиогенез представляет собой развитие сосудов из сосудов, имеющих в ране, в отличие от васкулогенеза – процесса образования новых сосудов.

Процесс заживления раны сопровождается активным метаболизмом и требует достаточного снабжения её кислородом [91].

Фибробласты, которые обнаруживаются в ране уже в первые 24 часа, нуждаются в адекватном снабжении кислородом для синтеза коллагена [157].

Фибробласты организуют внеклеточный матрикс и синтезируют эластин. Они являются ключевыми клетками, необходимыми для формирования грануляционной ткани и заживления раны.

Процесс начинается со считывания информации с ДНК в ядре клетки и образования соответствующей мРНК. Реализация генетической информации происходит на рибосомах эндоплазматического ретикулума.

Молекула коллагена состоит из трёх полипептидных цепей, в которых часто встречается комбинация аминокислот «глицин – пролин-х». Для реакции гидроксирования пролина и лизина требуется достаточное насыщение тканей кислородом, а также присутствие в качестве кофактора аскорбиновой кислоты. После поступления во внеклеточное пространство в процессе формирования волокон коллаген подвергается различным модификациям, а его распад регулируется тканевыми колагеназами, синтезируемыми различными клетками, находящимися в ране. В свою очередь снижение активности колагеназ происходит после связывания её с белком плазмы крови и тканей α_2 -макроглобулином. Первичный коллаген тоньше и располагается параллельно коже. В процессе созревания рубца происходит реорганизация коллагена. При этом не только изменяется количество коллагена в ране, но и происходят его качественные изменения. Процентное соотношение коллагена 3-го типа, характерного для грануляционной ткани, уменьшается в пользу увеличения содержания коллагена 1-го типа [64].

Быстрое созревание и ремоделирование рубца приводит к быстрому заживлению раны и формированию малозаметного рубца, тогда как отклонение от этого процесса может приводить к образованию гипертрофических или келоидных рубцов, а также к появлению хронических длительно незаживающих ран.

Миофибробласты – специальная форма фибробластов – способны сокращаться, уменьшают окончательные размеры раны, а также принимают активное влияние в процессе ангиогенеза, снижая активность матриксных металлопротеинкиназ [35].

Факторы, которые могут повлиять на заживление раны, можно разделить на местные и общие. К местным факторам относятся кислородонасыщение и инфекция, к общим – возраст, стресс, уровень половых гормонов, наличие сахарного диабета, приём лекарственных препаратов, ожирение, употребление алкоголя, курение, питание [100].

Процесс заживления хирургической раны замедляют такие факторы, как курение, наличие сахарного диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, хронических обструктивных заболеваний лёгких, мужской пол, пожилой возраст, загрязнение хирургической раны, потеря крови, сама операция [58, 151].

Доказано влияние избыточного веса на развитие послеоперационных осложнений – таких, как раневая инфекция, расхождение краёв раны, серомы, гематомы [145, 191, 192].

В то же время пониженная масса тела, дефицит белков, жиров, витаминов и микроэлементов также приводят к удлинению сроков заживления послеоперационных ран [119].

Некоторые микроэлементы (магний, медь, цинк, железо) являются необходимыми для оптимальной регенерации тканей [51, 67, 161].

Вредные привычки, такие как курение и злоупотребление алкоголем, также влияют на процесс заживления хирургических ран. Клинические испытания и эксперименты на животных показали, что злоупотребление алкоголем приводит к ухудшению заживления ран и увеличивает риск инфекционных осложнений [45, 46, 47, 168].

Применяемые в клинической практике лекарственные препараты могут оказывать существенное действие на процесс заживления раны. Например, глюкокортикостероиды могут предотвратить излишний иммунный ответ, стимулирующий пролиферацию фибробластов и синтез коллагена, образование келоидных рубцов [87, 95, 114, 155].

Нестероидные противовоспалительные препараты способны оказывать отрицательное влияние на заживление ран. В исследованиях на животных с применением ибупрофена продемонстрирован антипролиферативный эффект со снижением количества фибробластов, снижением прочности рубцовой ткани на разрыв, замедленное сокращение раны, задержка эпителизации [88, 175].

С учётом важности проблемы заживления хирургической раны предпринимаются попытки ускорить процесс заживления и предотвратить осложнения.

А. Atiba и соавторы (2011) исследовали влияние перорального приёма алоэ вера на процесс заживления послеоперационной раны на двух группах животных (крысы с сахарным диабетом 2-го типа). В ходе проведённого исследования выявили, что в группе, получавшей алоэ вера, процесс заживления протекал значительно лучше, чем в контрольной группе. Алоэ вера оказывает иммуностимулирующее действие на выработку VEGF, что значительно влияет на ангиогенез, а также активизирует работу фибробластов в ране [52].

Таким образом, в современном понимании заживление раны и образование рубца представляет собой сложно регулируемый процесс, состоящий из многочисленных последовательно проходящих реакций между клетками и формирующимся внеклеточным матриксом [70, 189]. Этот процесс регулируется хемоаттрактантами и митогенами, а многочисленные факторы роста дают клеточные и молекулярные сигналы, необходимые для нормального хода событий [62, 75, 76, 78, 81, 82, 110, 194].

Заживление раны и образование рубца зависит от многих факторов. Так, внешние или внутренние факторы могут ослабить или замедлить процесс репарации. Различные факторы роста обеспечивают клеточные и молекулярные сигналы, необходимые для нормального заживления раны [43, 99, 195].

Поиск новых путей оптимизации заживления хирургической раны, в том числе основанных на использовании молекулярных внутриклеточных регуляторных механизмов, представляется актуальным [147].

1.3 Митогенактивируемые протеинкиназы.

Влияние p38 MAP-киназы на развитие соединительной ткани

Одним из перспективных способов влияния на рост соединительной ткани может стать воздействие на компоненты внутриклеточных сигнальных каскадов. При этом в качестве мишеней могут выступать белки, обеспечивающие передачу сигналов с мембранных рецепторов в ядро клетки. Это позволяет регулировать пролиферативную и синтетическую активность клеток при различных исходных

стимулах. Такими свойствами обладают внутриклеточные протеинкиназы, которые активируются под действием митогенов – MAP-киназы.

Исследования [106, 141] показали, что каскадные гены MAPK были сохранены во время эволюции, и свидетельствуют о том, что каскады MAPK играют жизненно важную роль в развитии плода и в ответах на абиотические стрессы и трансдукцию гормонального сигнала.

MAPK – это важное звено в регуляции экспрессии генов при делении клеток, дифференцировке, апоптозе под действием внешних стимулов [122].

Стимуляторами активности MAP-киназных каскадов могут выступать различные факторы как химической (гормоны, цитокины, факторы роста и т. д.), так и физической природы (УФ-воздействие).

В настоящее время выделяют 14 семейств MAP-киназ, которые по своим функциональным характеристикам объединены в 6 групп:

1. Группа ERK (extracellular signal-regulated kinases) – киназы, активируемые внеклеточными сигналами – факторами роста, цитокинами, канцерогенами [79, 92].

2. Группа JNK (c-Jun N-terminal kinase) – стресс-активируемые протеинкиназы, участвующие в процессах пролиферации, дифференцировки клеток и их апоптозе, а также в процессах воспаления. JNK MAP-киназы запускаются под действием цитокинов, ультрафиолетового облучения [61, 187].

3. Группа p38 MAP-киназ, которые становятся активными при воздействии ультрафиолетового облучения, липополисахаридов, факторов роста и провоспалительных цитокинов и отвечают за клеточную дифференцировку и апоптоз клеток [77]. Группе p38 MAP-киназного каскада принадлежит важная роль в регулировании воспалительного процесса и формировании боли при воспалении [41].

4. ERK5 – группа MAP-киназ, которая участвует в пролиферации клеток и активируется факторами роста и другими внеклеточными сигналами.

5. ERK3/4 – атипичные MAP-киназы, которые после активации транслоцируются в ядро и вызывают фосфорилирование факторов транскрипции [68].

6. ERK7/8 – MAP-киназы, которые до настоящего времени недостаточно изучены, активируются стрессом и митогенами. Суперэкспрессия может ингибировать клеточный цикл в S-фазе [63, 73].

МАР-киназы – уникальная система, позволяющая многократно усилить слабый сигнал, приходящий к поверхности клеток, и передать информацию внутрь клетки. Данный способ передачи сигнала очень удобен для формирования резких, «скачкообразных» ответов [3].

Активность МАР-киназ реализуется тремя способами:

1) МАР-киназа может сама переместиться в ядро и там фосфорилировать факторы транскрипции (например, белки c-Мус и Elk-1);

2) МАР-киназа может участвовать в реакции фосфорилирования фактора транскрипции в цитоплазме, который затем проникает в ядро и активирует транскрипцию соответствующих генов;

3) МАР-киназа может участвовать в реакции фосфорилирования ингибитора фактора транскрипции, с которым этот фактор непосредственно связан [31].

Из этого разнообразия сигнальных каскадов в качестве мишени для целенаправленного изменения активности клеток в тканях при репаративных процессах и ремоделировании, с нашей точки зрения, наиболее интересна и перспективна группа p38 МАР-киназ, отвечающая за дифференцировку клеток, воспаление и апоптоз [143, 154].

Известно, что p38 МАРК-каскад влияет на воспалительный ответ. Так, активность p38 МАР-киназы оказывает значительное действие на уровень продукции цитокинов. Таким образом активация p38 МАРК оказывает влияние на гены, которые отвечают за транскрипцию провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1. W. I. De Воег обнаружил, что применение антагониста p38 МАРК RWJ67657 снижает уровень экспрессии цитокинов и эффект воздействия эндотоксина, что открывает перспективы для использования его в клинической практике [77].

Активация МАРК не только оказывает действие на продукцию факторов транскрипции, определяющих экспрессию генов, но и ведёт к активации синтеза соответствующих белков [97].

МАР-киназам как потенциальным регуляторам роста соединительной ткани до настоящего времени уделялось недостаточно внимания. Однако в ряде исследований такие влияния можно проследить. Так, установлено, что активация p38 МАРК ведёт к усилению фиброза. Такой эффект зафиксирован Х. J. Yue и соавторами (2016) при развитии лептоменингеального фиброза [180]. При этом активация p38 МАРК достигалась воздействием трансформирующего фактора роста $\beta 1$ на первичные менингеальные мезотелиальные клетки – наблюдалось значительное повышение экспрессии фактора роста соединительной ткани и p38 МАРК. Авторам удалось снизить экспрессию указанных факторов при применении блокатора p38 МАРК.

Об аналогичных наблюдениях в отношении гипертрофированной жёлтой связки сообщили Y. L. Сао и соавторы [170], в отношении фибробластов оболочки глаза – Y. H. Luo и соавторы [156].

О значении p38 МАР-киназного сигнального пути в развитии постишемического астроглиоза указывают данные R. G. Choudhury и соавторов [112].

Эндогенная стимуляция p38 МАРК, выявленная при подавлении активности Jnk-каскада, ведёт к ускоренному образованию соединительной ткани в зоне послеоперационного хирургического рубца [30, 50].

М. Li и соавторами продемонстрировано в эксперименте, что активация p38 влияет на ремоделирование внеклеточного матрикса в миокарде и развитие его контрактальной дисфункции. Применение вещества МКК6bE, активирующего p38 МАР-киназный каскад, существенно усиливало фиброз в миокарде, а применение его антагониста снижало интенсивность данного процесса [139].

Как известно, для гипертрофического кожного рубца характерна гиперпродукция коллагена фибробластами [35].

По мнению ряда авторов, фосфорилирование МАРК (ERK1/2, p38, JNK) под воздействием трансформирующего фактора роста $\beta 1$ играет важную роль в патогенезе развития гипертрофического кожного рубца [127, 131, 171, 197].

В опыте *in vitro* [174] при воздействии на фибробласты из гипертрофического рубца циклического механического воздействия (растяжение – сжатие) наблюдается усиление фосфорилирования p38 MAPK, повышение экспрессии α -гладкомышечного актина и трансформирующего фактора роста β 1. Предварительная обработка фибробластов блокатором p38 MAPK SB 203580 (4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]pyridine) нивелирует эти эффекты.

Интересно исследование, касающееся возможного участия активации MAPK в развитии фиброза в печени. I. M. Westra и соавт. (2016) при изучении фиброза в дольках печени при инкубировании срезов *in vitro* в течение 48 часов выявили повышение уровня экспрессии белка теплового шока (HSP47), проколлагена 1A1 и повышение уровня коллагена 1-го типа. Применение блокатора p38 MAPK SB 203580 продемонстрировало снижение уровня экспрессии белка теплового шока (HSP47) и проколлагена 1A1 [105].

R. Ito и Q. Zhang указывают на то, что большинство длительно незаживающих ран встречаются у людей старше 60 лет, и эффективное лечение таких ран отсутствует. Так, механизмы, приводящие к ним, остаются малоизученными. Авторы считают, что изучение MAP-киназного сигнального пути может привести к важным результатам для лечения таких ран [113].

Однако развитие внеклеточного компонента соединительной ткани зависит не только от уровня продукции матрикса фибробластами, но и от процессов перестройки соединительнотканых волокон с участием ферментов – металлопротеаз [71, 152]. Как известно, сигнальные каскады митоген-активируемой протеинкиназы регулируют экспрессию металлопротеаз [49].

Такие эффекты оказываются различными для разных типов клеток [104, 136].

MAPK группы p38 играют важную роль в индукции металлопротеаз, отвечающих за перестройку внеклеточного матрикса [20], а ERK медирует их репрессию в фибробластах [109].

Усиление продукции матриксных металлопротеаз церамидом и TNF- α в фибробластах кожи опосредуется через активацию ERK 1/2, JNK и p38 MAPK.

J. Westermarck и соавторы показали, что ингибирование p38 при помощи специфического ингибитора SB 203580 блокирует IL-1-опосредуемую экспрессию генов матриксных металлопротеаз 1 и 3 в фибробластах и эндотелиоцитах человека, а индукция матриксной металлопротеазы 13 при контакте с коллагеном зависит от активации p38 MAPK [142].

1.4 Использование блокаторов p38 MAP-киназ

В настоящее время производится поиск веществ для активного воздействия на данные системы как широкого, так и селективного действия, способных блокировать MAP-киназные каскады. Единой химической классификации таких веществ на настоящий момент не существует, и данные соединения рассматриваются как потенциальные лекарственные средства. Только фирмой Tocris Bioscience (United Kingdom) на 30.08.2017 г. производилось 23 ингибитора p38 MAPK, 12 ингибиторов JNK MAPK и 8 ингибиторов ERK MAPK.

Исследования, посвящённые изучению возможности блокады p38 MAP-киназного сигнального пути, проводятся по самым различным направлениям.

В онкологии показано, например, что селективные блокаторы p38 MAP-киназ, такие как BIRB-796 (Doramipimod), усиливают цитотоксичность и ингибируют рост паракринной опухоли при множественной миеломе, SCIO-469 (Talmapimod) уменьшают пролиферацию и адгезию клеток миеломы, усиливают апоптоз клеток миеломы и ингибируют рост опухоли [118].

Для селективного ингибитора p38 LY2228820 (Ralimetinib) проведена I фаза клинических испытаний у пациентов с прогрессирующим раком (колоректальный рак, меланома), которая продемонстрировала приемлемую безопасность, переносимость и фармакокинетику препарата [40].

При раке груди блокирование p38 MAP-киназы существенно тормозило начало метастазирования опухоли [138].

В нейрологии блокада p38 MAP-киназного сигнального пути приводит к существенному снижению нейровоспаления при ишемических атаках

и внутримозговом кровоизлиянии [44], и блокатор p38 MAPK SB 203580 в эксперименте на крысах значительно облегчал тяжесть неврологических проявлений при аутоиммунном неврите [49].

В кардиологии выявлено, что блокада p38 MAP-киназ улучшала функционирование сердечной мышцы во время ишемии [140].

В исследовании D. Carter и соавторов показано, что местное применение блокатора p38 MAP-киназ на ожоговую рану приводит к снижению продукции интерлейкинов (IL) IL-6 и IL-1 β и MIP-2 в коже и уровней IL-6 и экспрессии цитокина MIP-2 в плазме крови, даже тогда, когда блокатор накладывали на рану через 4 часа после ожога и при ожоге кожи на всю её толщу. Авторы считают, что местное применение блокатора p38 MAP-киназ может быть полезным в клинической практике лечения ожогов [80].

Подавляющее большинство исследований по использованию блокады p38 MAP-киназного сигнального пути проведено в эксперименте.

К сожалению, клиническое применение ингибиторов MAPK в настоящее время ограничено недостаточной эффективностью ингибиторов, возможно, обусловленной недостаточным дозированием данных препаратов из-за побочных эффектов, или индукцией других киназ, которые могут взять на себя роль p38 MAP-киназ при активации клеток [120, 123, 132].

В наших исследованиях, проведённых ранее [9] методом электронной микроскопии, обнаружено, что местное введение блокатора JNK MAP-киназы на 3–14-е сутки приводит к картине, которая характерна для высокой активности фибробластов. Внутри клеток наблюдали крупные ядра с выраженной складчатостью мембраны ядра, с большим количеством крупных ядрышек, а в цитоплазме фибробластов была хорошо развита эндоплазматическая сеть с большим количеством рибосом. Локальное применение блокатора JNK MAP-киназы SP 600125 статистически значимо усиливало образование коллагена в зоне формирования рубца. Так на 3-и сутки раневого процесса количество коллагена в 4 раза превышало соответствующий показатель в группе контроля. Статистически значимые различия в продукции коллагена сохранялись в течение

1 месяца. В то же время использование блокатора JNK MAP-киназы SP 600125 статистически значимо не влияло на относительный объём коллагена в интактной коже.

Таким образом, к настоящему времени накоплены большие знания о лечении ран, однако основная их часть имеет эмпирический или описательный характер. Лечение различных травм или ран, возникших как следствие заболеваний, привело к накоплению бесценного хирургического опыта. Пластическая хирургия определила правила нанесения разрезов и их зашивания, а также сформулировала принципы замещения дефектов тканей. Однако приходится констатировать, что пока мы только хотели бы добиться естественного неосложнённого хода событий и не мечтаем усовершенствовать природу, чтобы иметь возможность формирования рубцов с заданными свойствами в заданные сроки или заживления раны без образования рубца.

Многочисленные экспериментальные исследования указывают на то, что MAP-киназные сигнальные каскады были сформированы в процессе эволюции и играют важную роль в таких биологических процессах, как воспаление и регенерация. Эти процессы теснейшим образом связаны с развитием и перестройкой соединительнотканых структур. Понимание роли MAPK-каскадов в этих процессах открывает возможность разработки способов воздействия на рост соединительной ткани.

К настоящему времени в доступной нам литературе отсутствуют сведения о местном применении блокаторов p38 MAP-киназ в хирургической ране для управления процессом заживления и образования рубца.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ

2.1 Моделирование кожно-мышечной раны

Эксперимент проведён на 63 самцах крыс линии Wistar, у которых изучали местное действие блокатора p38 MAP-киназы на заживление кожно-мышечной раны (Рисунок 1), нанесённой в асептических условиях, и последующее образование рубца. Вес животных составлял 220–250 г, а возраст – 9 месяцев. Исследования выполнены на базе ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (директор – д.м.н., профессор В. А. Сороковилов). Работа с экспериментальными животными (моделирование патологического процесса, наблюдение за животными, выведение из эксперимента) проводилась на базе отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии». Животные содержались в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище.



Рисунок 1 – Модель кожно-мышечной раны

Содержание и экспериментальные действия с животными осуществляли по правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986), и в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием

экспериментальных животных» (Приложение к Приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755).

Исследование было одобрено комитетом по этике ФГБНУ ИНЦХТ.

Животные были разделены на две группы по 30 животных:

1) контрольная – нанесение раны, внесение в рану лекарственной плёнки без активного вещества [18];

2) основная – изучение воздействия блокатора р38 MAP-киназы SB 203580 (Tocris bioscience, кат. № 1202 Bath № 4 A/95665) (Рисунок 2) на заживление раны (нанесение раны, введение в рану блокатора р38 MAP-киназы в составе лекарственной плёнки [18], наблюдение за заживлением раны), доза на одно животное – 1,05 мкг (4,2 мкг/кг).

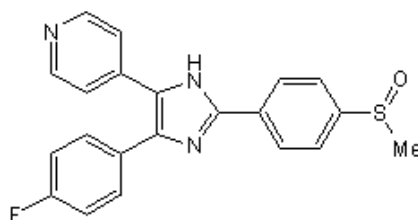


Рисунок 2 – Блокатор р38 MAP-киназы SB 203580

Расчёт дозы препарата на одно животное проводили на основании IC_{50} [69]. Как известно, для блокатора р38 MAP-киназы SB 203580 IC_{50} составляет 50 и 500 nM для р38 и р38β2 соответственно [165].

В качестве контроля для оценки механических свойств неизменённой кожи служили исследования, выполненные на трёх интактных животных.

Разработанная нами модель кожно-мышечной раны в клинических условиях наиболее полно соответствует ране, возникающей при субпекторальном увеличении молочных желез через субмаммарную борозду.

Перед началом операции в области спины крысы сбривали участок шерсти и тщательно обрабатывали кожу раствором антисептика. Далее крысе давали общий наркоз внутрибрюшинным введением смеси кетамина 50 мг/кг, дроперидола 2,5 мг/кг и атропина 0,4 мг/кг.

Оперировали в стерильных условиях операционной вивария. Одноразовым лезвием скальпеля № 15 крысам наносили рану по паравертебральной линии,

проникающую через кожу и подкожную клетчатку. Длина раны составляла 5 см. Затем рассекали собственную фасцию и в продольном направлении тупым путём раздвигали мышечные волокна длинной мышцы спины для формирования вместилища под лекарственную плёнку. Тщательно останавливали кровотечение и помещали в рану лекарственную плёнку с медленной резорбцией, содержащую для основной группы блокатор p38 MAPK SB203580, для контрольной группы – плёнку без активного ингредиента [18]. Кожу и подкожную клетчатку зашивали однорядным узловым швом нитью пролен 4/0 (Ethicon) на атравматической круглой игле. Интервал между стежками составлял 1 см. Снятие швов осуществляли через 7 суток.

В сроки 2, 6 и 12 часов и 1, 3 (по 3 животных в группе), 7, 14 и 30 суток (по 5 животных в группе) крыс выводили из эксперимента передозировкой раствора тиопентала натрия, введённого внутривенно. Для исследования забирали ткани из области раны, фиксировали раствором FineFix (Milestone, Италия) для последующего гистологического и иммуногистологического исследований. На нефиксированных фрагментах послеоперационного рубца на 7-е, 14-е и 30-е сутки методом тензиометрии проводили определение механических характеристик рубца аппаратом собственного изготовления.

2.2 Определение механических характеристик сформированного рубца на модели кожно-мышечной раны

Сразу после выведения животного из эксперимента скальпелем вырезали участок ткани в области ранее нанесённой кожно-мышечной раны шириной 1 см, взятый перпендикулярно её плоскости, который включал в себя по 1 см ткани с каждой стороны от формирующегося рубца, и исследовали его методом тензиометрии аппаратом собственного изготовления.

Ткань фиксировали зажимами в тензиометре и к образцу ткани, прикладывали силу в направлении перпендикулярном плоскости раны. Нагрузку

увеличивали дискретно, начиная с 50 грамм-сил с шагом 50 грамм-сил (от 0,4903 Н, шаг 0,4903 Н), и доводили до достижения разрыва образца.

В области пластической деформации скорость нарастания нагрузки до достижения разрыва составляла 5 гс/с.

Измеряли удлинение в ответ на прилагаемую нагрузку. Вычисляли относительное удлинение как отношение длины при приложении силы к начальной длине образца. Определяли предел прочности образца в направлении, перпендикулярном линии раны, точку перехода упругой деформации в пластическую деформацию, а также рассчитывали модуль упругости Юнга. Для каждого образца стоили свой график.

После определения значения силы, вызывающей разрыв образца, вычисляли значение разрушающей нагрузки как отношение приложенной разрушающей силы к площади поперечного сечения образца по формуле:

Разрушающая нагрузка = F / S , где: F – сила в Ньютонах; S – площадь поперечного сечения, перпендикулярного направлению действия силы.

В зоне упругой деформации рассчитывали модуль упругости Юнга – коэффициент, характеризующий сопротивление материала растяжению/сжатию при упругой деформации:

$E = F / S \times L / \Delta L$, где: E – собственно модуль упругости, измеряемый в Паскалях; F – сила в Ньютонах; S – площадь сечения; L – длина деформируемого образца; ΔL – модуль изменения длины образца в результате упругой деформации.

Сравнение показателей проводилось между группами, а также по отношению к поведению на нагрузку интактной кожи.

Исследование проведено в сроки 7, 14 и 30 суток после операции, а также у интактных животных. От каждого животного исследовали по 3 образца.

2.3 Морфологические и морфометрические исследования

Фиксацию иссечённых фрагментов из зоны послеоперационного повреждения проводили в растворе FineFix (Milestone, Италия). Затем

осуществляли стандартную гистологическую проводку и заливку в парафиновые блоки, на микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 3 мкм.

Препараты окрашивали гематоксилин-эозином, по методу Ван Гизона (на выявление коллагеновых волокон) [10, 54]. Исследование проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа Nikon 80i (Япония). Размерная метка представлена на каждой микрофотографии.

Проводили морфометрические исследования с использованием программы ImageJ (Национальный институт здоровья, США).

В каждом образце фотографировали при увеличении $400\times$ по 10 зон в области рубца, в зоне, прилегающей к зоне рубца, и в интактной дерме.

Для оценки формирования грубоволокнистой соединительной ткани на микрофотографиях при использовании окраски по методу Ван Гизона, определяли соотношение площади, занимаемой окрашенными волокнами коллагена, к общей площади ткани на срезе [32]:

$$S_{отн} = \frac{S_{колл}}{S_{тк}} \times 100\%$$

где: $S_{отн}$ – относительная площадь коллагена на срезе; $S_{колл}$ – площадь, занимаемая коллагеновыми волокнами; $S_{тк}$ – площадь исследуемой ткани на микропрепарате.

2.4 Иммуногистохимические и иммунофлюоресцентные исследования

Для проведения иммуноморфологических исследований срезы толщиной 5 мкм монтировали на предметные стёкла с адгезивным покрытием (поли-L-лизин) (Thermo Scientific-Menzel, Германия). Препараты депарафинировали последовательно в толуоле в течение 5 минут, затем в этиловом спирте понижающейся концентрации – 100° , 96° , 90° , 70° – по 1 минуте, после чего помещали в дистиллированную воду на 10 минут.

Демаскирование антигенов проводили в цитратном буфере при $\text{pH} = 6,0$ в микроволновой печи мощностью 800 Вт в течение 20 минут. Образцы на препаратах обводили гидрофобным карандашом Dako Pen (Dako, Code S2002).

Для иммуногистохимического исследования проводили блокирование эндогенной пероксидазы нанесением 3%-го H_2O_2 в течение 5 минут, тщательно отмывали Трис-буфером ($\text{pH} = 7,6$).

Неспецифическое связывание с антигенными эпитопами блокировали нанесением 0,4%-го раствора казеина в течение 5 минут, отмывали Трис-буфером ($\text{pH} = 7,6$).

Затем на образцы наносили первичные антитела в рабочем разведении:

1) Actin monoclonal antibody (Rabbit) (Epitomics, Cat. № 1844-1, Lot D 091805), 1:200;

2) CD34 (ICO 115) monoclonal IgG (Mouse) (Santa Cruz, Cat. N Sc-7324, Lot CO909), 1:300.

Инкубацию препаратов проводили во влажной камере при комнатной температуре в течение 1 часа, тщательно отмывали Трис-буфером ($\text{pH} = 7,6$), после чего препараты инкубировали с вторичными антителами Novolink Polymer (Novocastra, Lot 711236), меченными пероксидазой в течение 30 минут, отмывали Трис-буфером ($\text{pH} = 7,6$).

На срезы наносили субстратную смесь, содержащую 3'3'-диаминобензидин в 0,05%-м H_2O_2 (Novocastra, Lot 710550), на 5 минут, отмывали водой. Докрашивание ядер клеток проводили гематоксилином. Затем срезы дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и толуоле, заключали в среду Permanent Slide Mounting Medium (Novocastra, Lot 713708), подвергали световой микроскопии.

При проведении иммунофлюоресцентного исследования для усиления сигнала на препараты после демаскирования наносили Image-iT FX signal enhancer (Invitrogen. Cat. N I 36933, Lot 681688), инкубировали в течение 30 минут. Отмывали фосфатно-солевым буфером ($\text{pH} = 7,6$).

Для блокады неспецифического окрашивания наносили раствор сыворотки козы (нормальной) (Invitrogen, Lot 757418A), инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут.

Затем на срезы помещали первичные антитела в рабочем разведении, инкубировали в течение 1 часа:

1) CD34 (ICO 115) monoclonal IgG (Mouse) (Santa Cruz, Cat. N Sc-7324, Lot C 0909), рабочее разведение 1:300;

2) MMP9 monoclonal antibody IgG (Rabbit) (Epitomics, Cat. N 2551-1, Lot YG 113001P), рабочее разведение 1:200;

3) антитела к CD45 (OX 30) monoclonal IgG (Mouse) (Santa Cruz, Cat. N Sc-53047, Lot B 2409), рабочее разведение 1:300;

4) антитела к Endoglin (M-20) goat polyclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-19793, Lot I 0908), рабочее разведение 1:300.

После промывки Трис-буфером (pH = 7,6) наносили вторичные антитела на 30 минут:

1) Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-11029, Lot 898236), рабочее разведение 1:300;

2) Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N 11034, Lot 870976), рабочее разведение 1:300;

3) Alexa fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-11031, Lot 822389), рабочее разведение 1:300;

4) Alexa fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-1105 Lot 870969), рабочее разведение 1:300.

Проводили процедуры как одинарного, так и двойного мечения.

Промывали Трис-буфером (pH = 7,6), ядра докрашивали Dapi (Biotium, Cat. N 40011, Lot 8D 0605).

Для визуализации специфической окраски и фотографирования образцов использовали микроскоп Nikon Eclipse 80i с камерой Nikon DS-Fi1c с приставкой для эпифлюоресценции (Япония) и фильтрами Nikon DAPI, Nikon B-2A, Nikon TRITC. Размерная метка представлена на каждой микрофотографии.

2.5 Электронно-микроскопические исследования

Образцы ткани из области послеоперационного рубца, взятые на 3-и и 7-е сутки, фиксировали в 2,5%-м глutarовом альдегиде на 0,1 М какодилатном буфере (pH = 7,4) в течение 2 часов. Тщательно отмывали 0,1 М какодилатным буфером (pH = 7,4), проводили дофиксацию образцов в 1%-м растворе черырёхокси осмия, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, пропиленоксиде, пропитывали и заливали в Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, США) [23]. На ультратоме «LKB» (LKB, BROMMA, Швеция) изготавливали ультратонкие срезы, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Образцы исследовали на электронном микроскопе «ТЕМ-410» (Голландия).

Морфологические, иммуноморфологические, электронно-микроскопические исследования проведены на базе лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (заведующая лабораторией – д.м.н., профессор РАН И. А. Шурыгина).

2.6 Методы статистического анализа

Нормальность распределения количественных показателей определялась по критерию *W* Шапиро – Уилка (Shapiro – Wilk's test). Дисперсионный анализ (ANOVA) проводился с проверкой гипотезы о равенстве дисперсий совокупности выборок при помощи модификации Levene's test. Для оценки значимости различий в попарно сравниваемых группах использовали критерий Манна – Уитни; при оценке механических свойств использовался метод множественных сравнений Шеффе [11]. При проведении всех видов статистического анализа критический уровень значимости критериев принимался равным 0,05. Данные представлены в виде: среднее $\pm$ ошибка среднего ($M \pm SE$) – при нормальном распределении; медиана [25% квартиль – 75% квартиль] ($Me [Q25-Q75]$) – при несоответствии распределения критериям нормальности.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Особенности формирования послеоперационного рубца в условиях локального подавления активности p38 MAP-киназы при заживлении кожно-мышечной раны

Нами изучены закономерности заживления хирургической раны при снижении активности p38 MAPK в условиях однократного интраоперационного введения блокатора p38 SB 203580 в составе лекарственной плёнки с медленным высвобождением действующего вещества в зону репарации.

При исследовании процесса заживления раны у контрольной группы (введение лекарственной плёнки без активного действующего вещества) установлено, что репаративный процесс соответствовал канонам формирования послеоперационного рубца в условиях асептической раны.

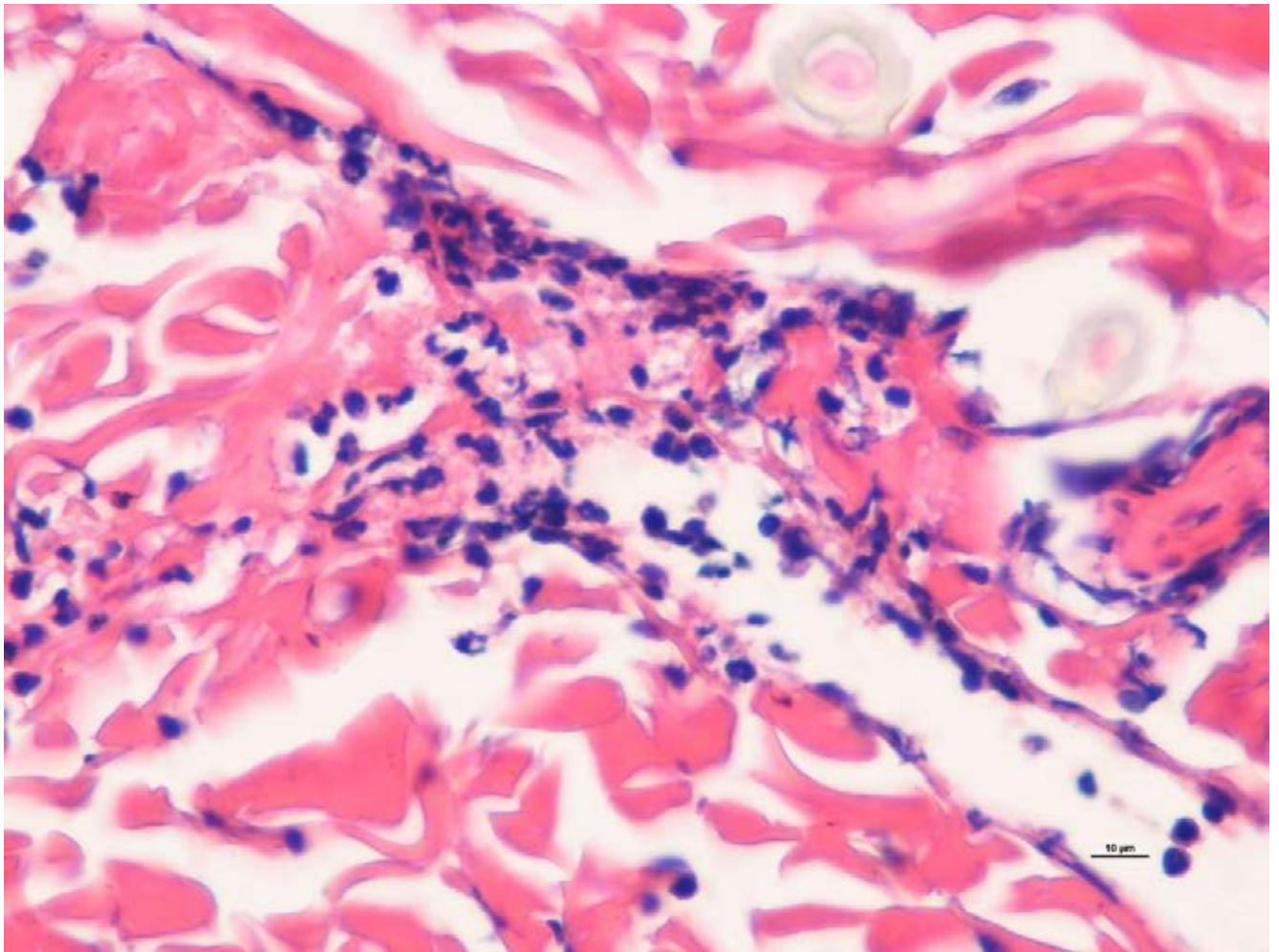


Рисунок 3 – Контрольная группа, 2 часа.

Нейтрофильная инфильтрация в зоне повреждения.

Окраска гематоксилин-эозином

Так, через 2 часа после моделирования раны отмечался отёк подкожной клетчатки, дермы, начиналась нейтрофильная инфильтрация в зоне раны (Рисунок 3).

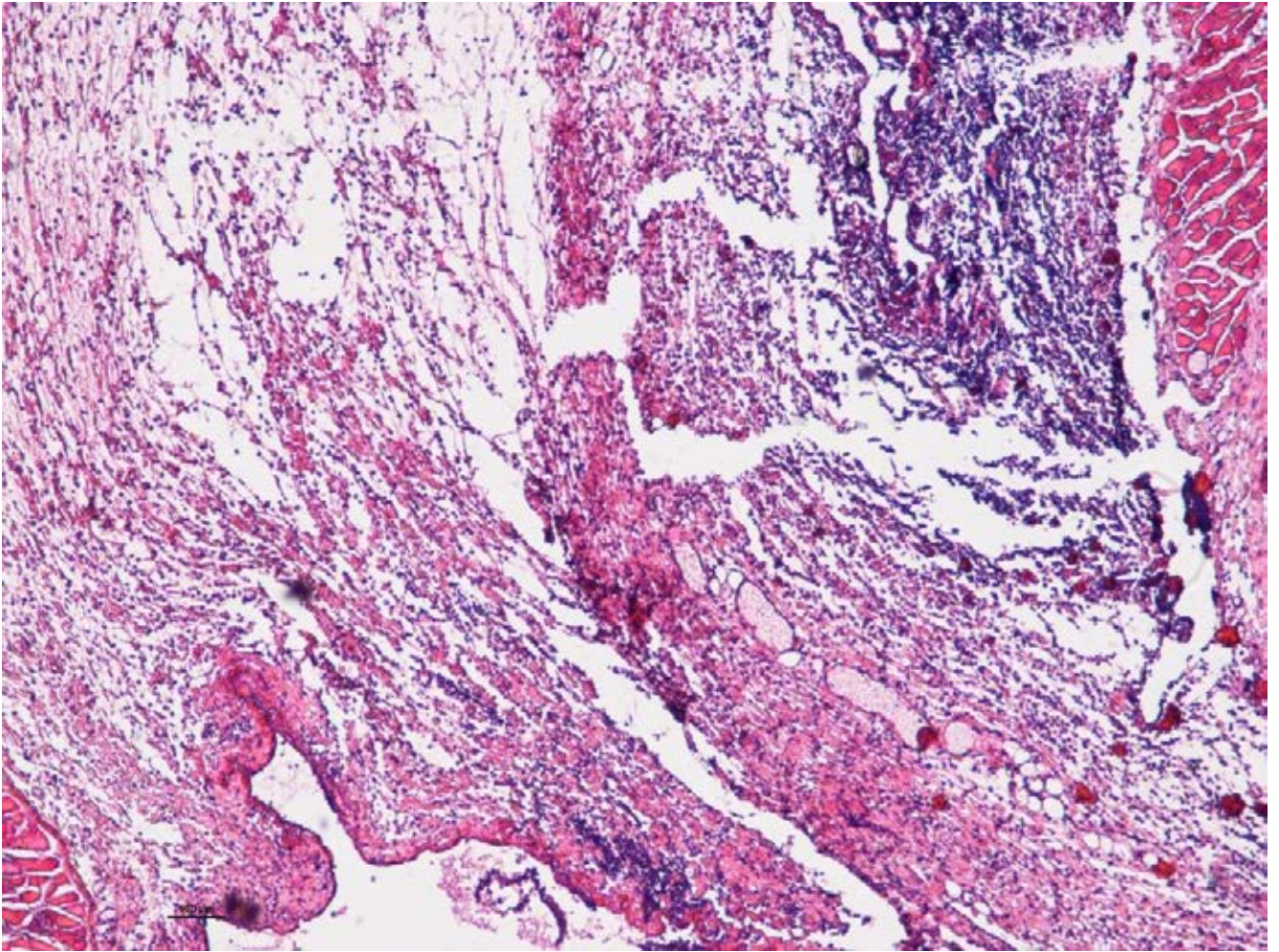


Рисунок 4 – Контрольная группа, 1-е сутки.

Обширная зона нейтрофильной инфильтрации в области раны.

Окраска гематоксилин-эозином

При исследовании через 6, 12 часов и 1 сутки (Рисунок 4) после повреждения сохранялись отёк и нейтрофильная инфильтрация, при этом максимальная выраженность нейтрофильной инфильтрации приходилась на срок 12 часов.

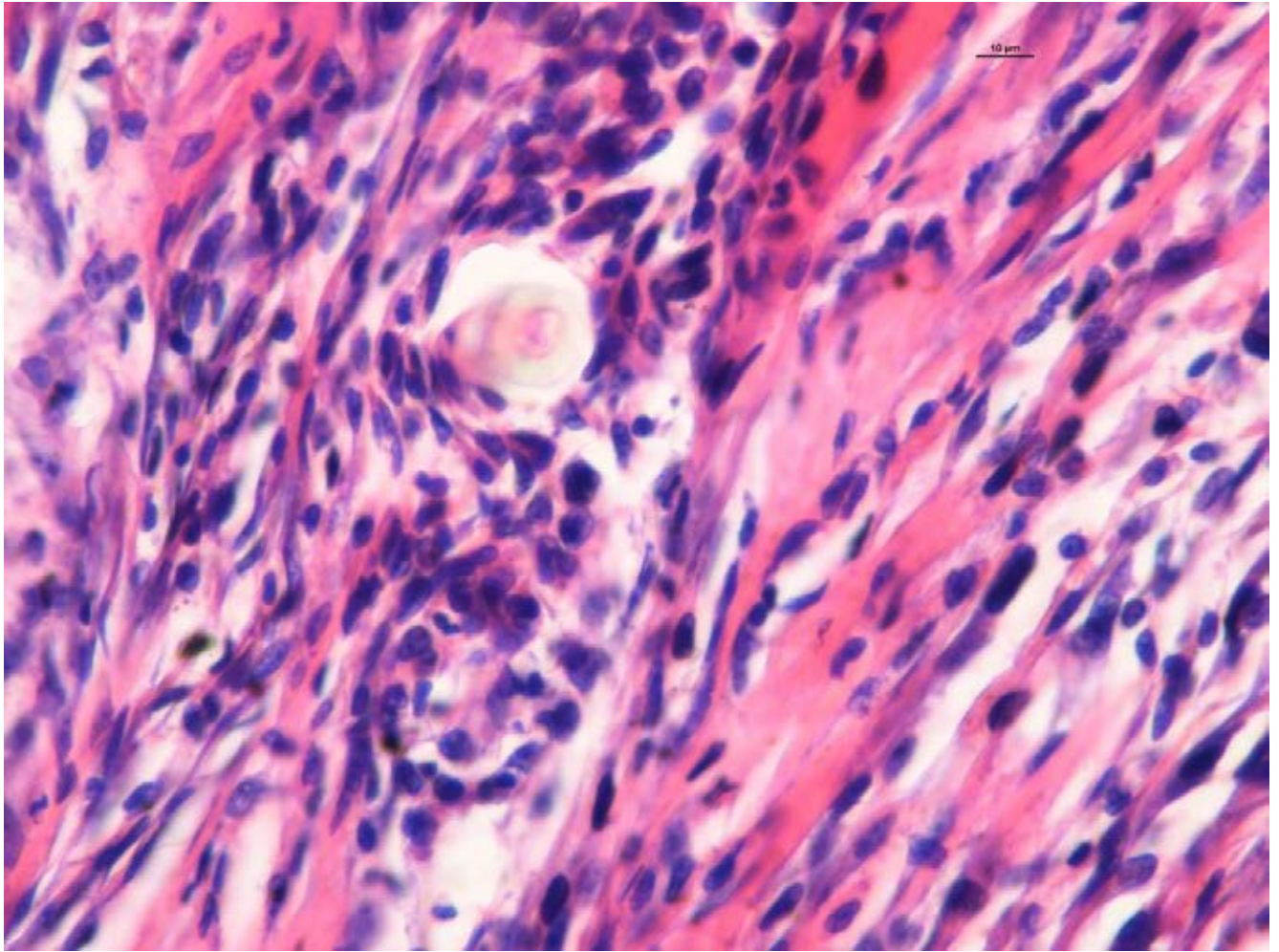


Рисунок 5 – Контрольная группа, 7-е сутки.

Соединительная ткань в области раны.

Окраска гематоксилин-эозином

С 3-х суток после моделирования раны у животных контрольной группы начиналась фибробластическая фаза воспаления – отмечалось формирование молодой грануляционной ткани, плотность фибробластов нарастала к 7-м суткам после моделирования (Рисунок 5).

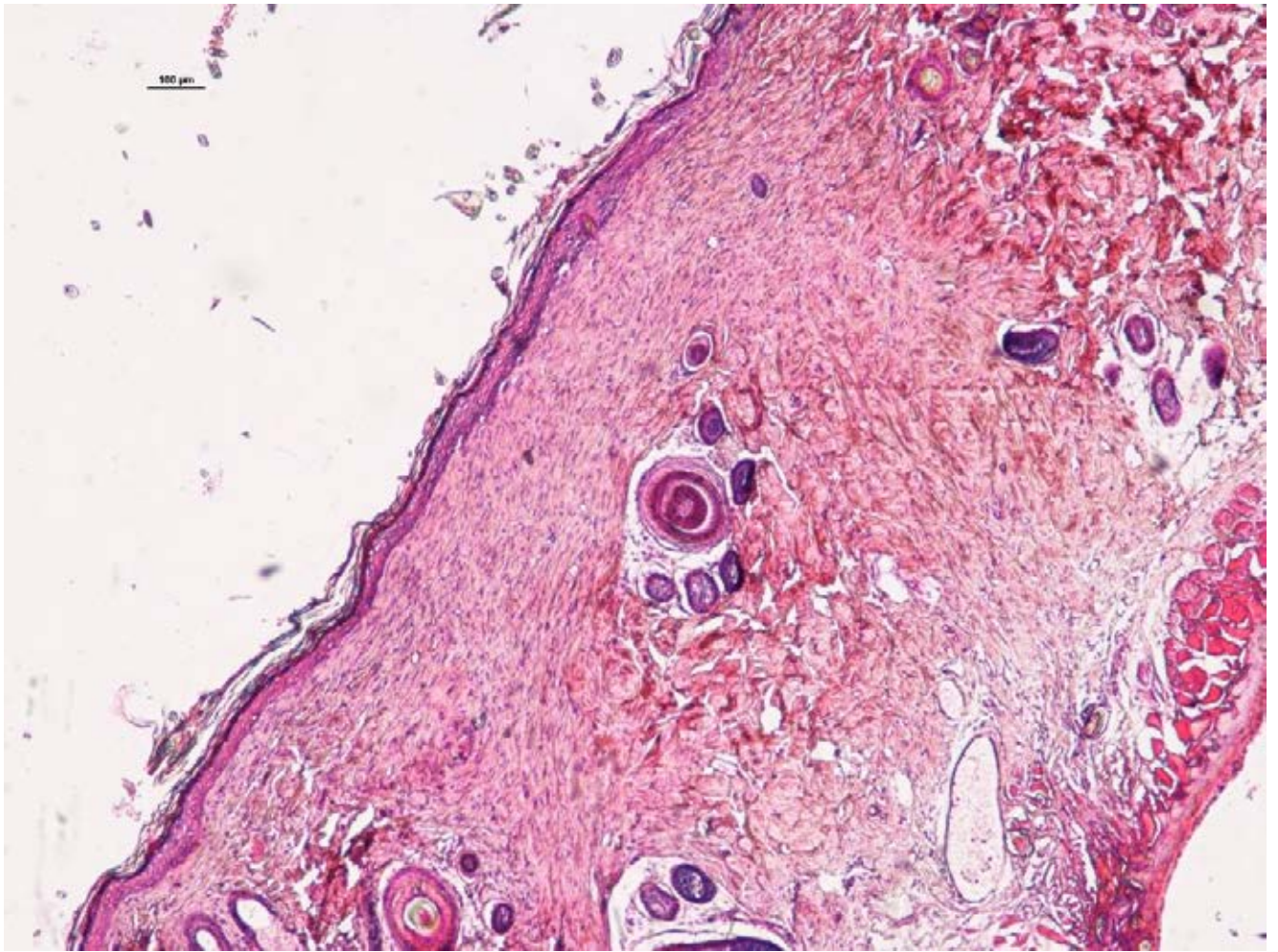


Рисунок 6 – Контрольная группа, 30-е сутки.

Выраженный рубец в области раны.

Окраска гематоксилин-эозином

В дальнейшем при морфологическом исследовании регистрировалось созревание соединительной ткани, и к концу наблюдения (30-м суткам) на месте раны формировался хорошо выраженный рубец, при этом плотность фибробластов в области раны снижалась (Рисунок 6).

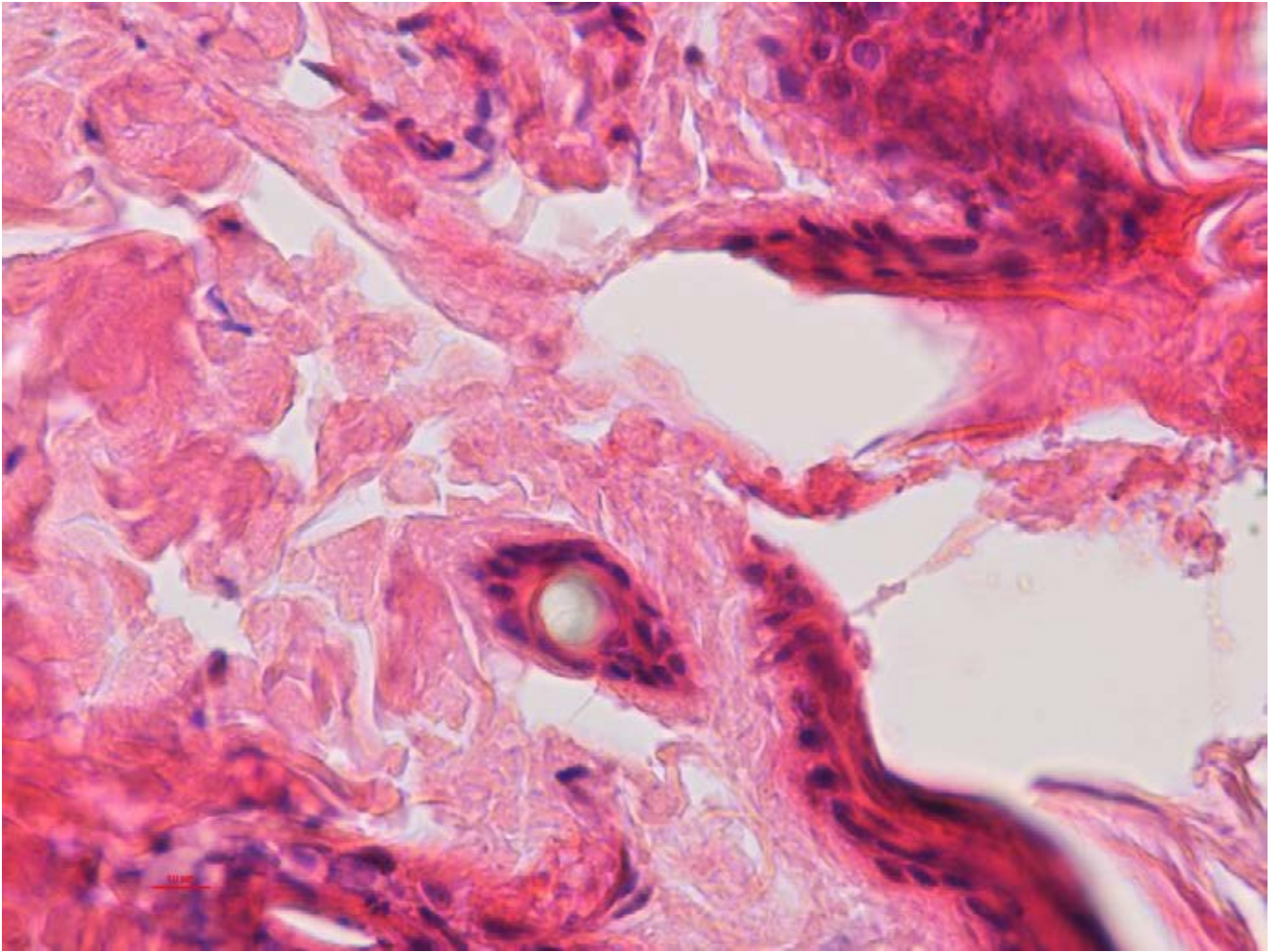


Рисунок 7 – Группа с блокадой р38 MAP-киназного каскада, 2 часа.
Отсутствие нейтрофильной инфильтрации, умеренный отёк в области раны.
Окраска гематоксилин-эозином

У животных, которым вводился блокатор р38, через 2 часа после нанесения травмы наблюдался умеренный отёк подкожной клетчатки в области раны, нейтрофильной инфильтрации не отмечено (Рисунок 7).

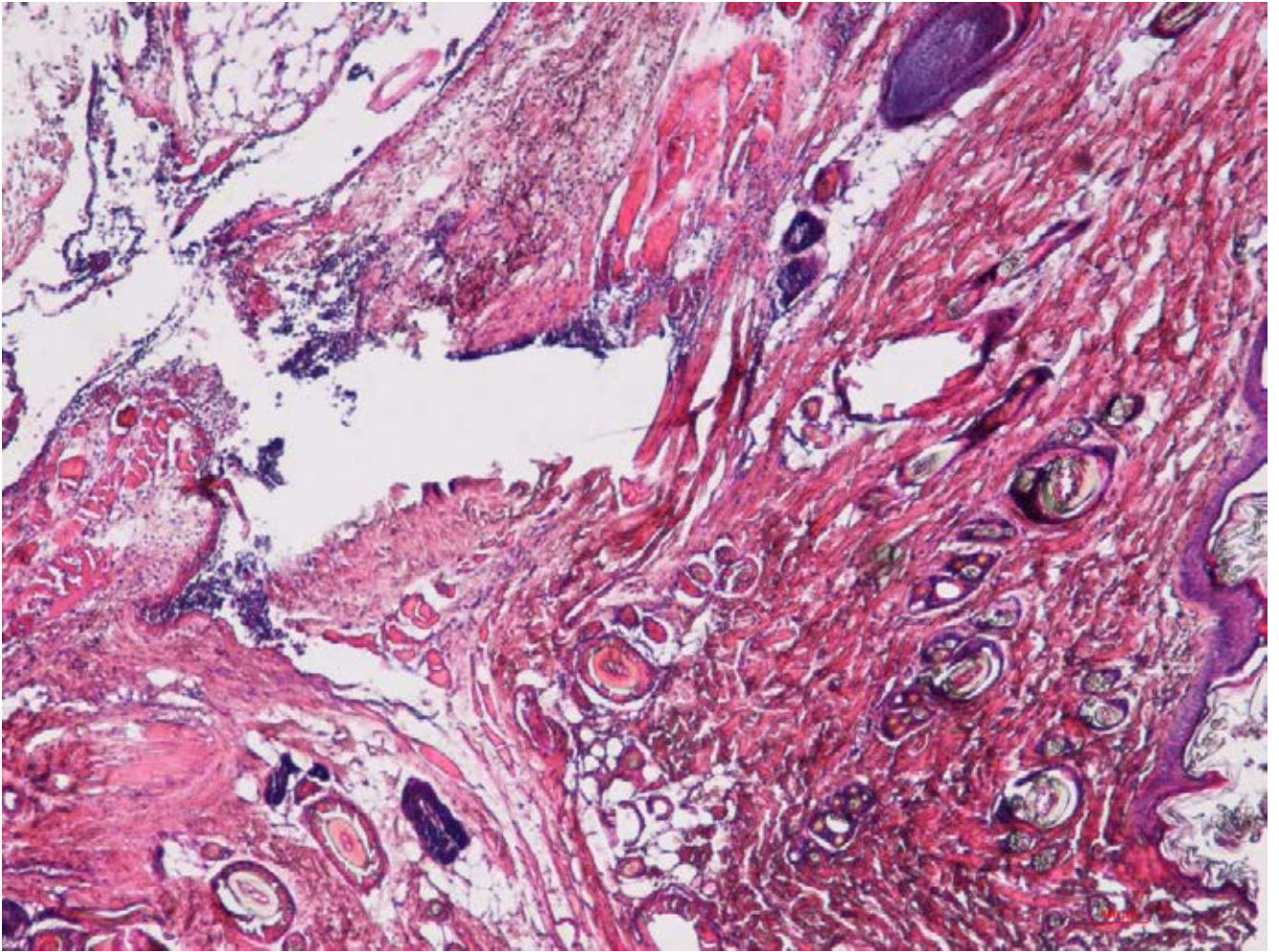


Рисунок 8 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 1-е сутки.

Слабовыраженная нейтрофильная инфильтрация,
маленькая площадь инфильтрации в области раны.

Окраска гематоксилин-эозином

Через 6 часов отмечены умеренная нейтрофильная инфильтрация и отёк области раны. Через 12 часов сохранялись умеренная инфильтрация зоны повреждения нейтрофилами и отёк. К 1-м суткам эксперимента выраженность нейтрофильной инфильтрации достигала максимума, однако она была значительно менее выраженной как по площади зоны инфильтрации, так и по плотности клеточных элементов, по сравнению с группой контроля (Рисунок 8).

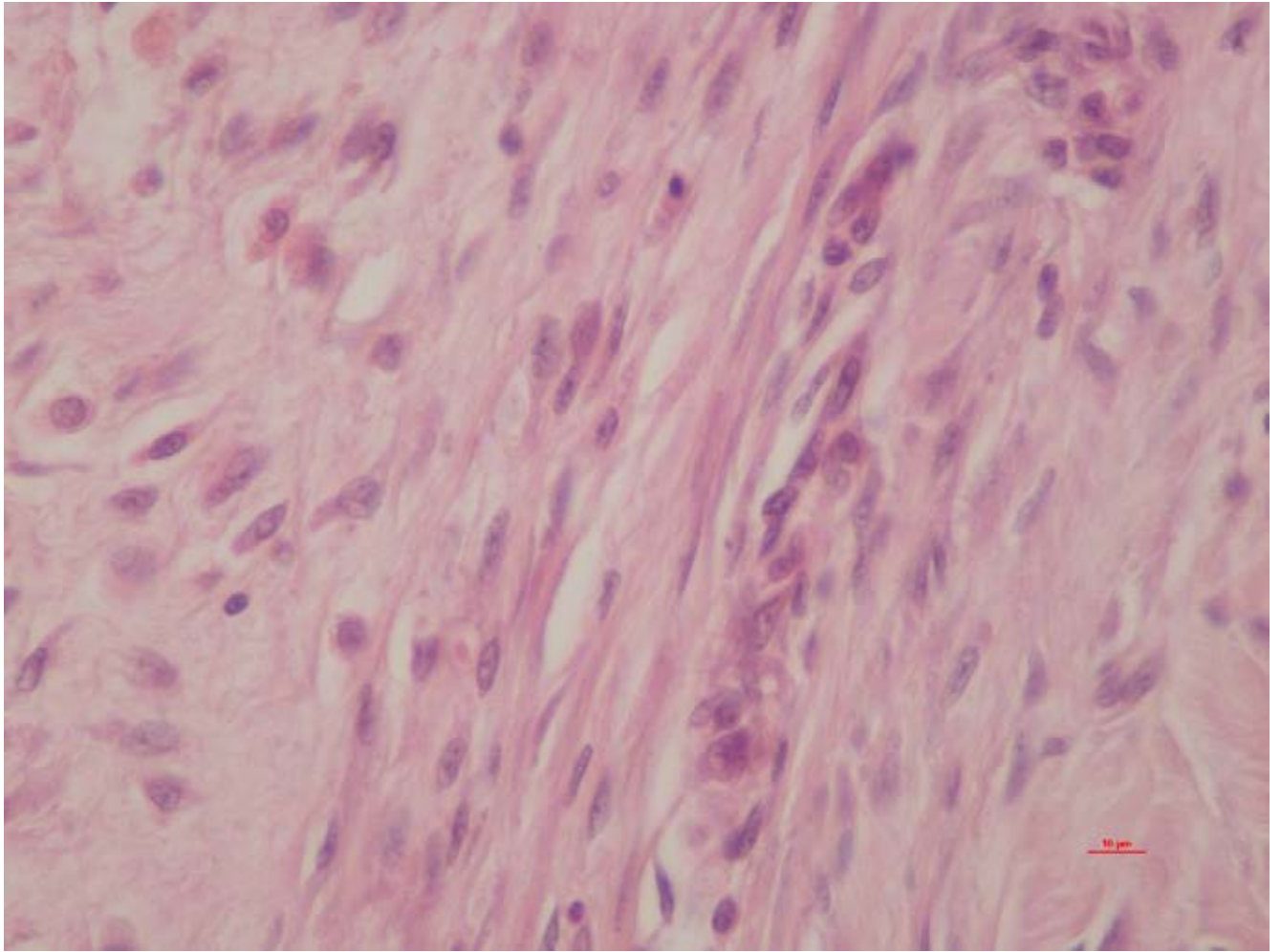


Рисунок 9 – Группа с блокадой р38 МАР-киназного каскада, 7-е сутки.

Низкая плотность клеток фибробластического ряда
в области формирующегося рубца.

Окраска гематоксилин-эозином

К 3-м суткам наступала фибробластическая фаза воспаления с началом формирования молодой грануляционной ткани. Однако и на 7-е сутки развитие соединительной ткани в области раны отставало от уровня группы контроля, зона формирования соединительной ткани оставалась очень узкой, с низкой плотностью клеточных элементов (Рисунок 9).

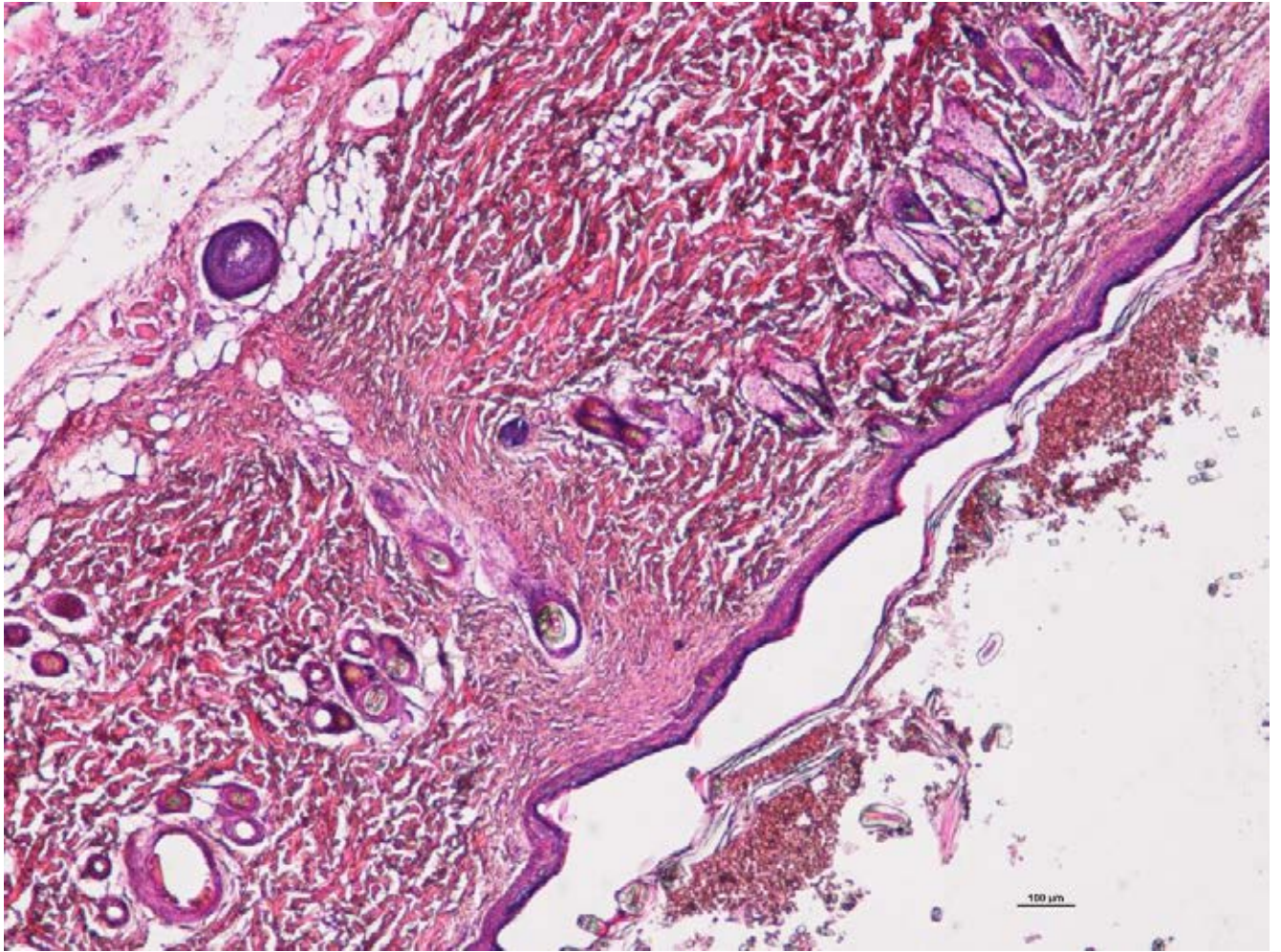


Рисунок 10 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 30-е сутки.

Очень узкий соединительнотканый рубец на месте раны.

Окраска гематоксилин-эозином

К 14-м суткам формировался узкий аккуратный рубец в области раны, наблюдалась полная эпителизация раны. К 30-м суткам на месте раны наблюдался зрелый очень узкий соединительнотканый рубец, малозаметный на коже (Рисунок 10).

Распределение ширины рубца в контрольной группе и в группе с введением блокатора p38 на 30-е сутки представлено на рисунках 10 и 11.

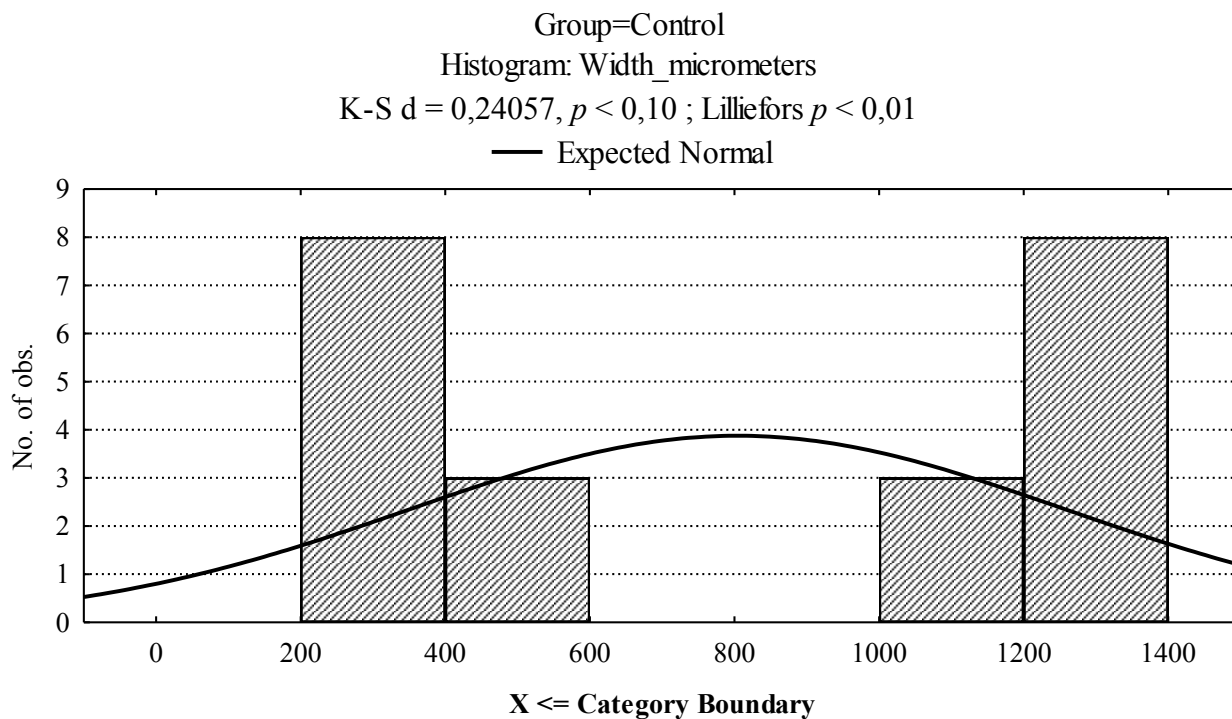


Рисунок 11 – Гистограмма распределения ширины рубца в области кожной раны на 30-е сутки у животных контрольной группы

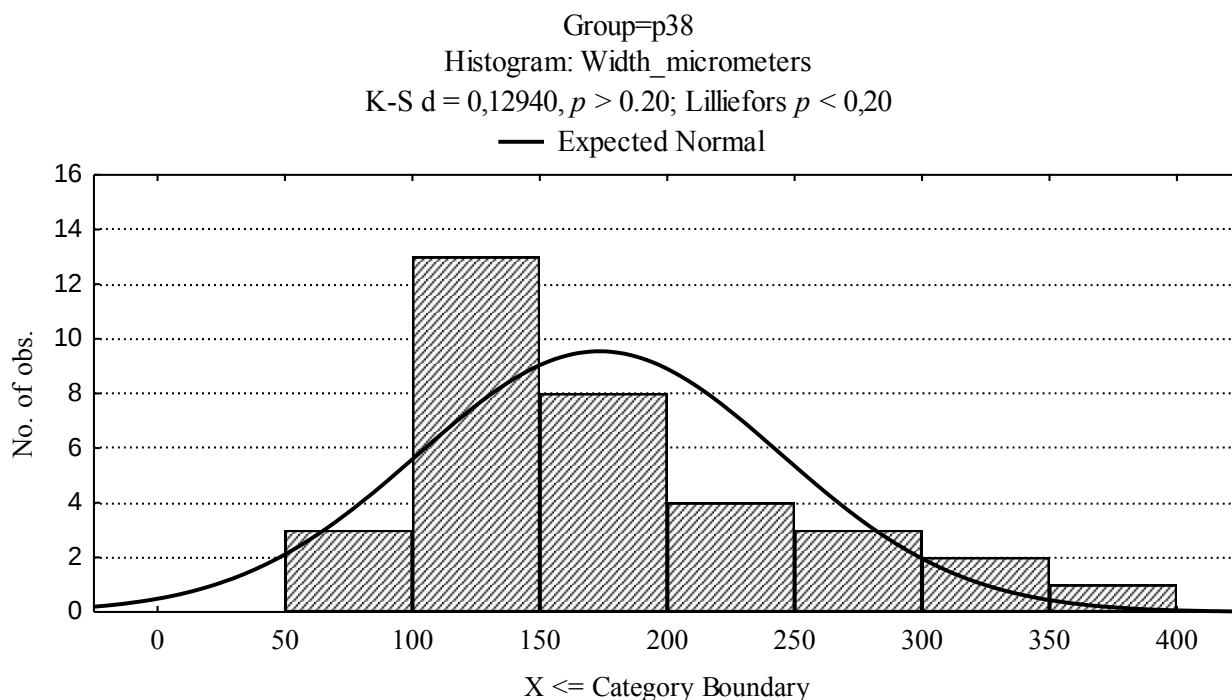


Рисунок 12 – Гистограмма распределения ширины рубца в области кожной раны на 30-е сутки у животных, получавших блокатор p38

У животных основной группы на 30-е сутки ширина сформированного рубца составляла 157,8 [120,11–206,45] мкм, в то время как у животных контрольной группы – 763,47 [334,1–1285,31] мкм. Различия статистически значимы – по критерию Манна – Уитни $Z = 6,073$, $p = 0,00001$ (Рисунок 13, Таблица 1).

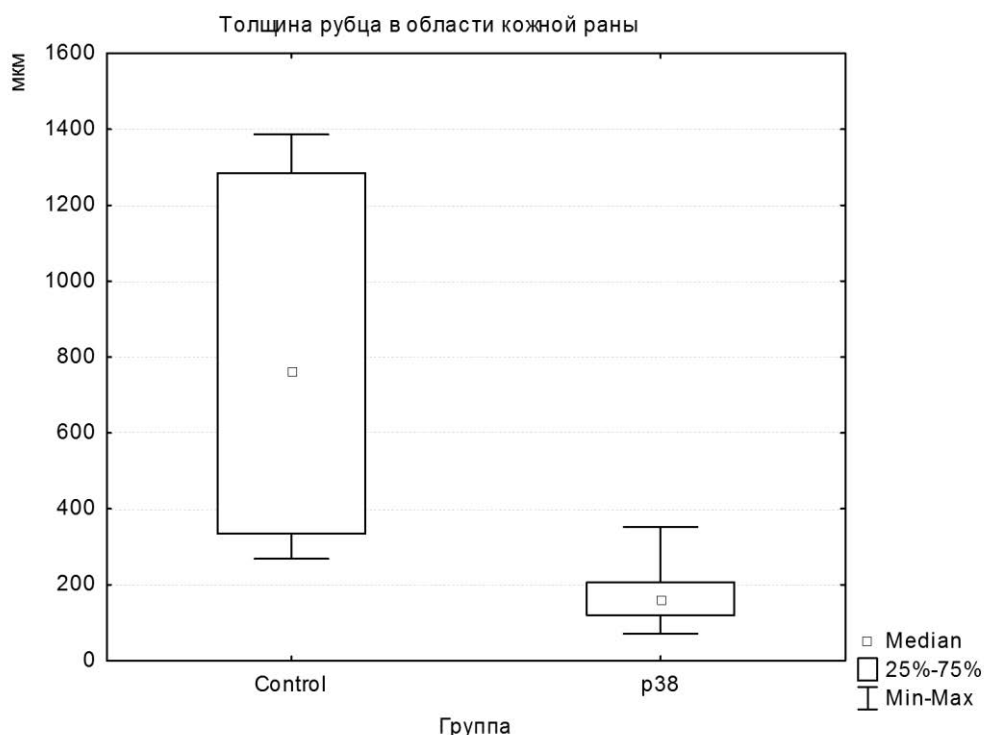


Рисунок 13 – Ширина рубца в области кожной раны на 30-е сутки у животных контрольной группы и животных, получавших блокатор p38

Таблица 1 – Различия по U-критерию Манна – Уитни в ширине рубца между контрольной группой и группой с введением блокатора p38

Параметр	Rank Sum – Control	Rank Sum – p38	U	Z	p -level
Ширина рубца, мкм	989,0000	607,0000	12,00000	6,073107	0,00001

Таким образом, блокада p38 MAP-киназного каскада в ранние сроки заживления хирургической раны в значительной степени изменяет воспалительный процесс, влияя на его различные фазы. При этом снижается выраженность нейтрофильной инфильтрации, подавляется выраженность фибробластической

фазы воспаления, что в итоге приводит к формированию статистически значимо более узкого послеоперационного рубца по сравнению с группой контроля. При этом необходимо отметить, что наблюдаемые эффекты были достигнуты при использовании оригинального способа местной доставки лекарственного средства при низкой используемой дозе и однократном применении действующего вещества.

3.2 Механическая прочность послеоперационного рубца при подавлении активности p38 MAP-киназы

Исследование механических свойств рубцов на экспериментальной модели методом тензиометрии показало, что при низких нагрузках поведение образцов соответствовало закону Гука: деформирующая сила и величина деформации были пропорциональны между собой. То есть при данных нагрузках образцы демонстрировали поведение, соответствующее поведению упругого тела. При больших нагрузках наблюдался переход упругой деформации в пластическую.

Выявлено, что точка перехода упругой деформации в пластическую в срок 7 суток после моделирования раны у экспериментальных животных значительно снижалась, по сравнению с интактной кожей. В дальнейшем наблюдалось постепенное повышение этого показателя.

При этом на 30-е сутки в группе животных, которым в рану вводили блокатор p38, данный показатель был статистически значимо выше, чем в группе контроля – соответственно, 8417 ± 503 и 5623 ± 164 кПа ($p = 0,0016$) (Рисунок 14).

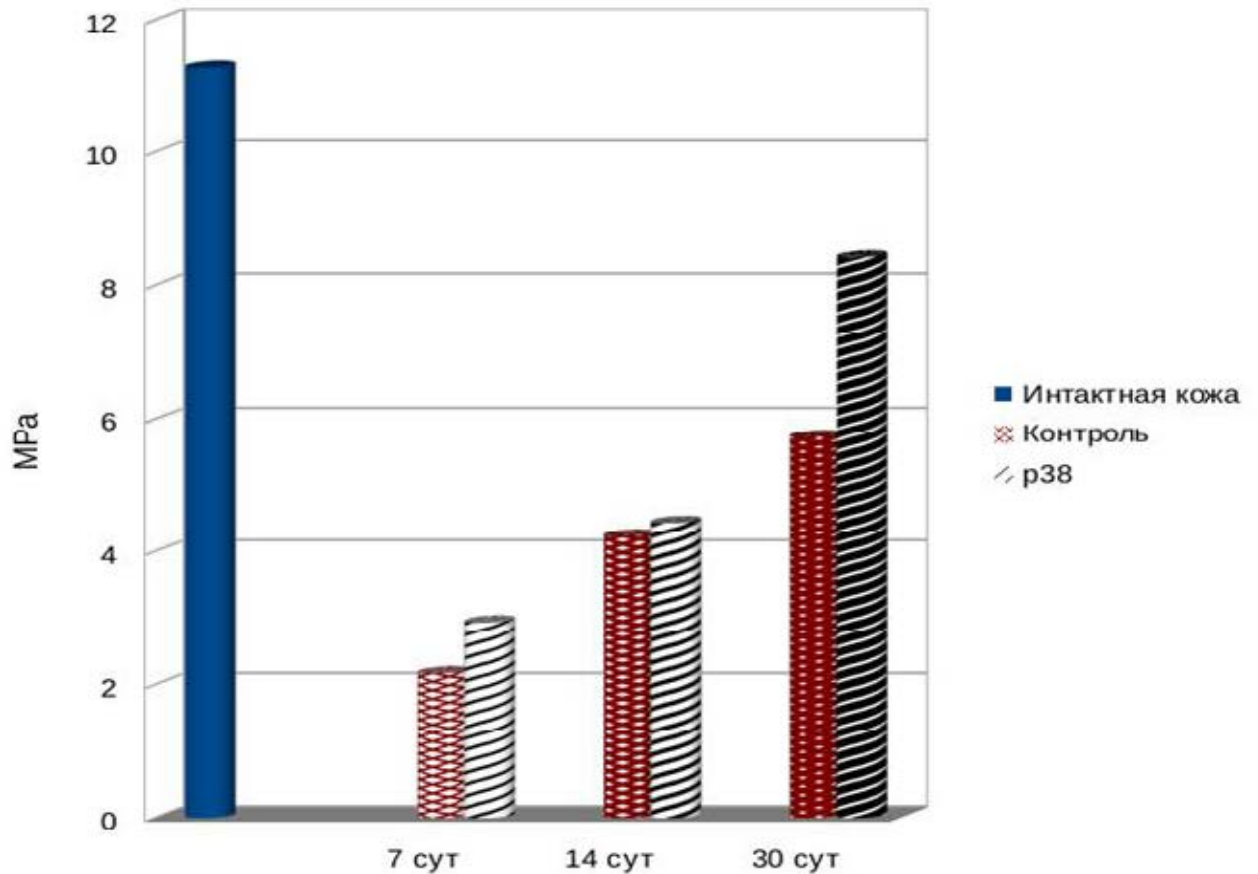


Рисунок 14 – Точка перехода упругой деформации
в пластическую деформацию

Разрушающая нагрузка, измеренная как отношение силы, приведшей к разрушению образца, к площади поперечного сечения образца, для интактной кожи превышала 12 МПа. Эта величина была значительно ниже у животных экспериментальных групп в ранние сроки заживления раны и постепенно повышалась по мере созревания образующегося рубца.

Так, на 7-е сутки после моделирования в контрольной группе разрушающая нагрузка составила 2758 ± 1466 кПа, в группе с блокадой p38 – 3687 ± 899 кПа (Рисунок 15).

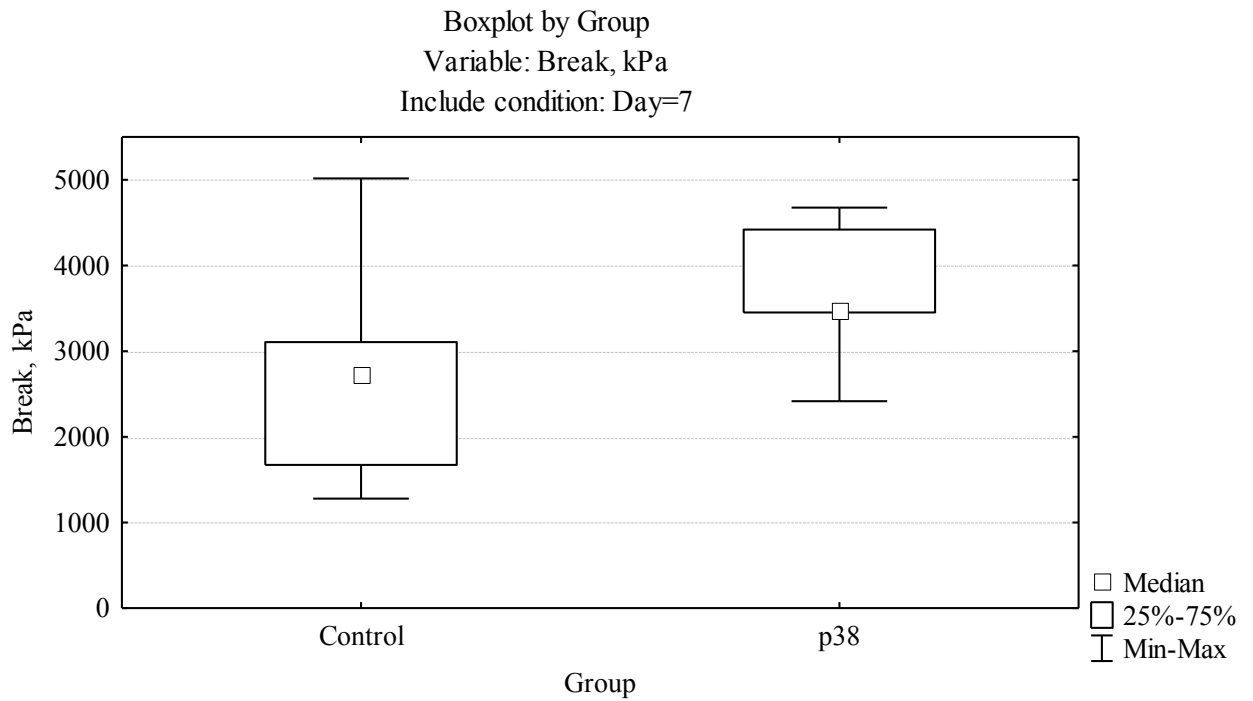


Рисунок 15 – Предел прочности образцов на 7-е сутки, кПа

На 14-е сутки прочность исследуемых образцов увеличилась. В контрольной группе она составила 4896 ± 768 кПа, в группе с введением блокатора p38 – 5175 ± 952 кПа. Показатели статистически не различались (Рисунок 16).

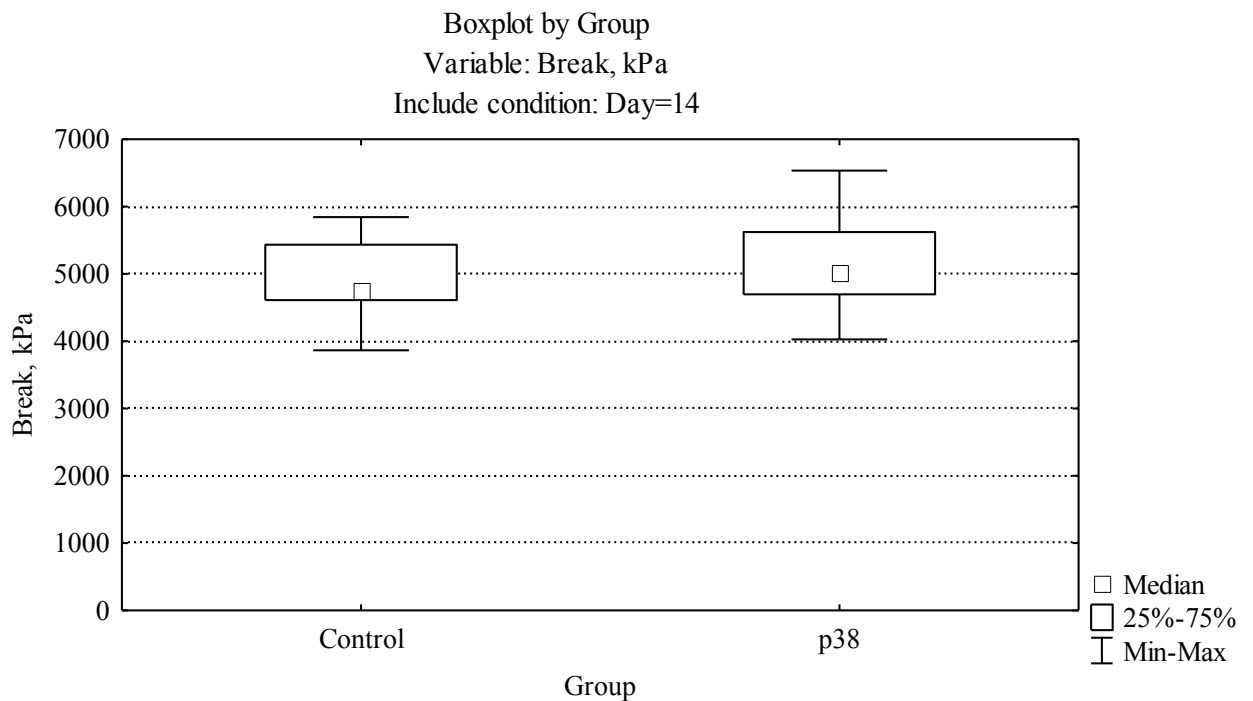


Рисунок 16 – Предел прочности образцов на 14-е сутки, кПа

К 30-м суткам прочность образцов достигала максимума за весь период наблюдений. Причём в группе с введением блокатора p38 она была статистически значимо выше, чем в контроле – 9130 ± 341 и 7872 ± 237 кПа ($p < 0,05$) (Рисунок 17).



Рисунок 17 – Предел прочности образцов на 30-е сутки, кПа

Динамика прочности исследуемых образцов представлена на рисунке 18.

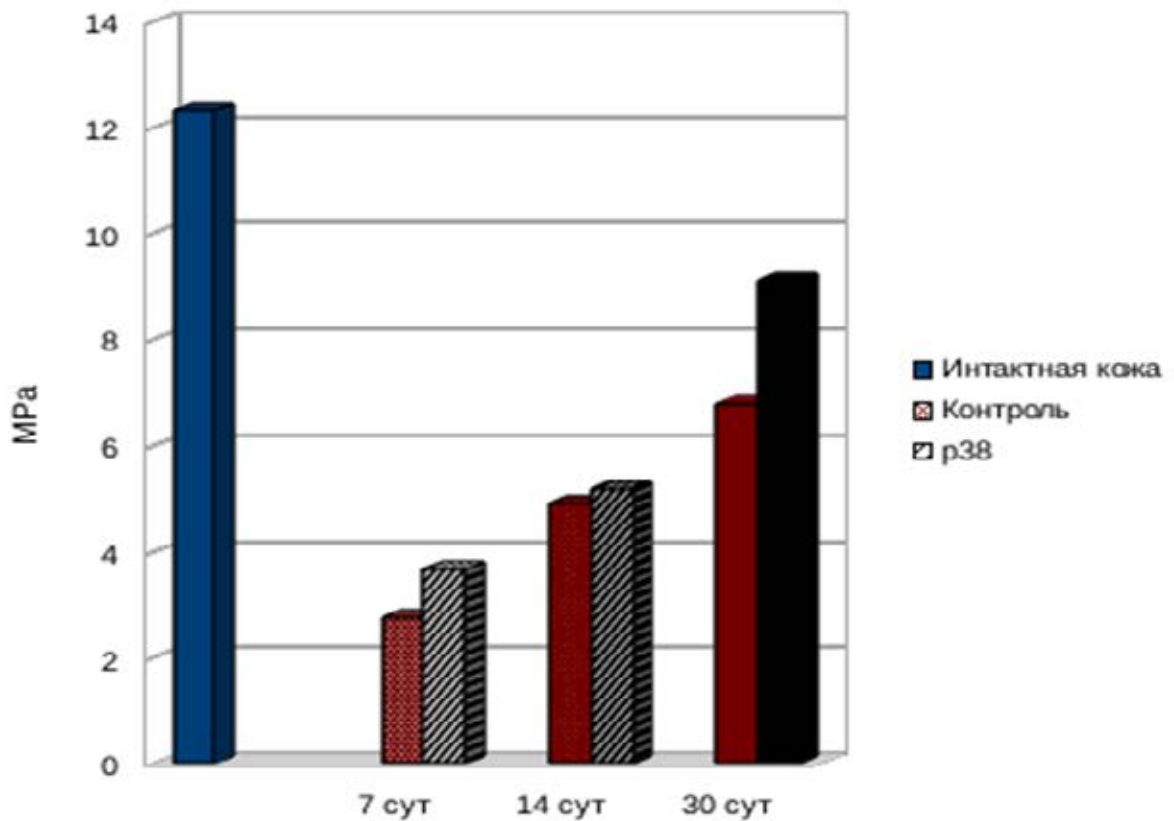


Рисунок 18 – Предел прочности образцов, кПа

Таким образом, наши исследования по изучению механических свойств рубца показали, что местная блокада p38 MAP-киназного сигнального каскада приводит к значительному изменению механических свойств рубца, образующегося на месте хирургической кожно-мышечной раны.

Локальное действие ингибитора p38 MAPK позволяет к 30-м суткам раневого процесса добиться образования рубца, при котором механические свойства образца тканей в его области (разрушающая нагрузка и точка перехода упругой деформации в пластическую деформацию) сильнее приближаются к показателям интактной кожи, чем в контроле.

3.3 Оценка синтеза коллагена при формировании послеоперационного рубца на фоне снижения активности p38 MAP-киназы

Как известно, оценка синтетической активности фибробластов проводится по продукции ими специфического белка – коллагена. Нами изучена способность

фибробластов синтезировать collagen в зоне образования послеоперационного рубца в фибробластическую фазу воспаления. Исследования проводились на гистологических препаратах, окрашенных по Ван Гизону, при этом оценивалась относительная площадь, занимаемая коллагеновыми волокнами [32].

Установлено, что у животных контрольной группы относительная площадь, занятая волокнами коллагена в зоне послеоперационной раны, закономерно возрастала от 3 до 30 суток, достигала максимальных значений к 30-м суткам – 73,54 [66,87–78,01] % (Рисунки 19, 20, 21).

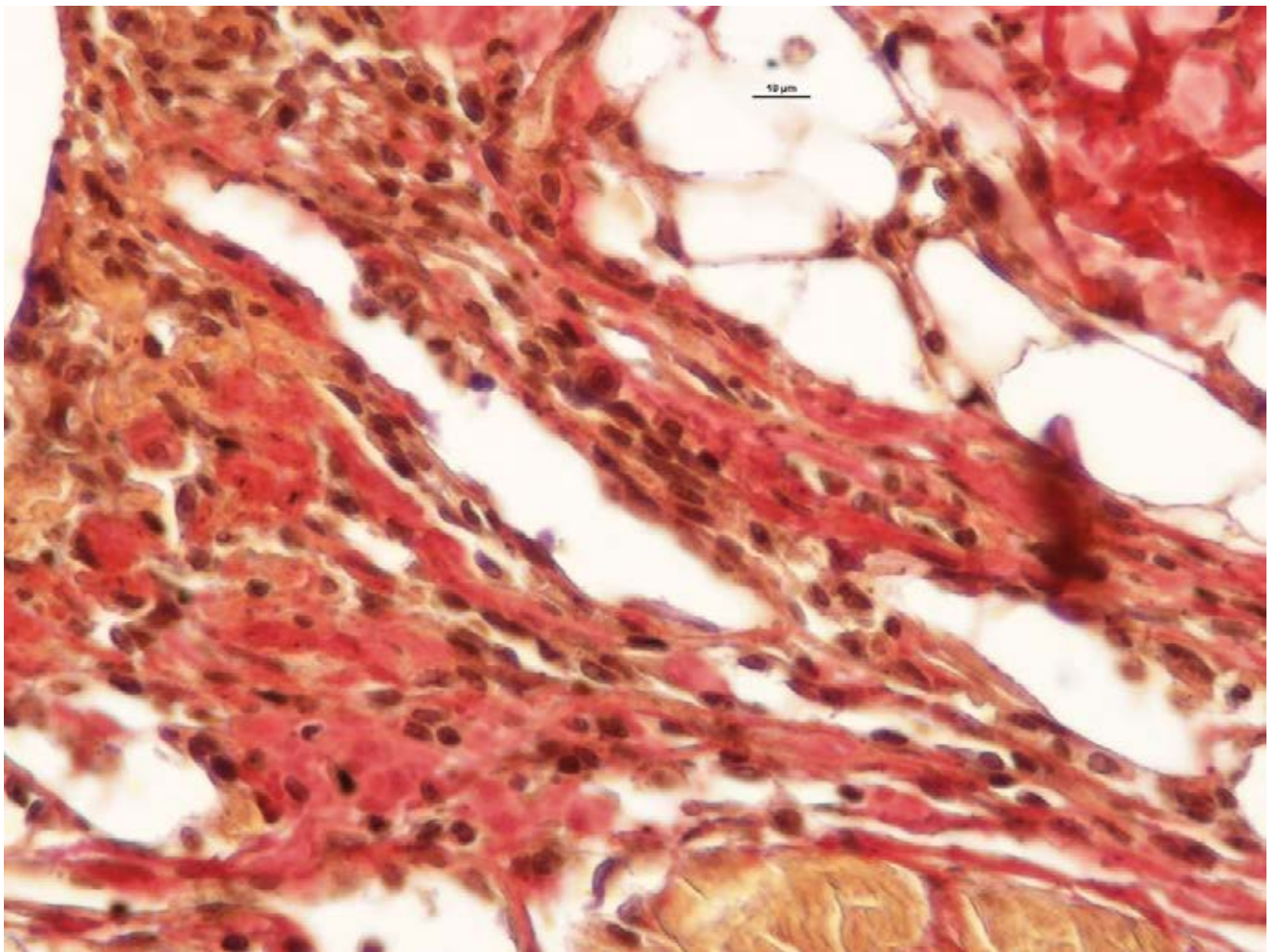


Рисунок 19 – Контрольная группа, 3-и сутки.

Коллагенообразование в области раны.

Окраска по Ван Гизону

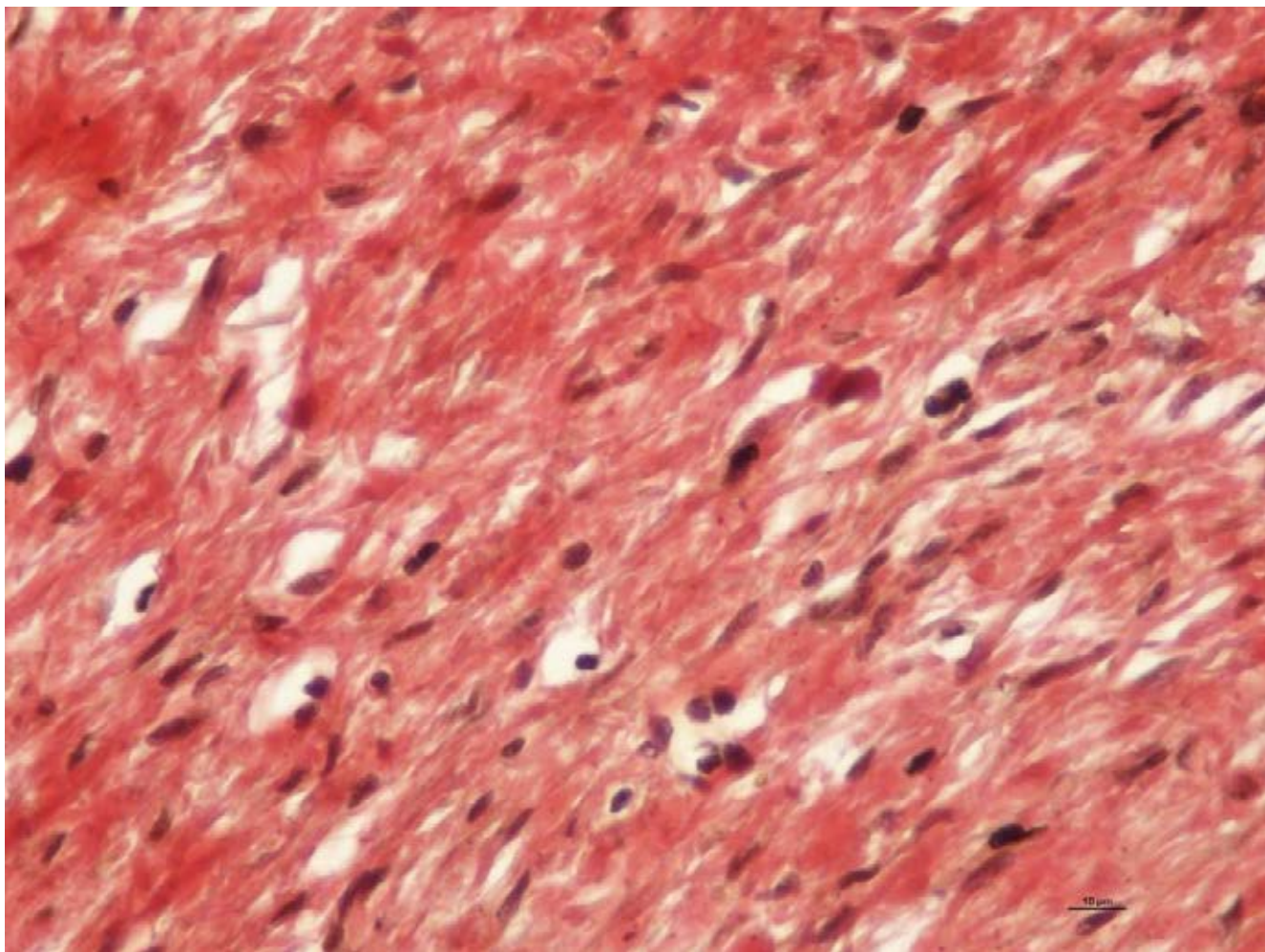


Рисунок 20 – Контрольная группа, 30-е сутки.

Плотно упакованные волокна коллагена в зоне послеоперационного рубца.

Окраска по Ван Гизону

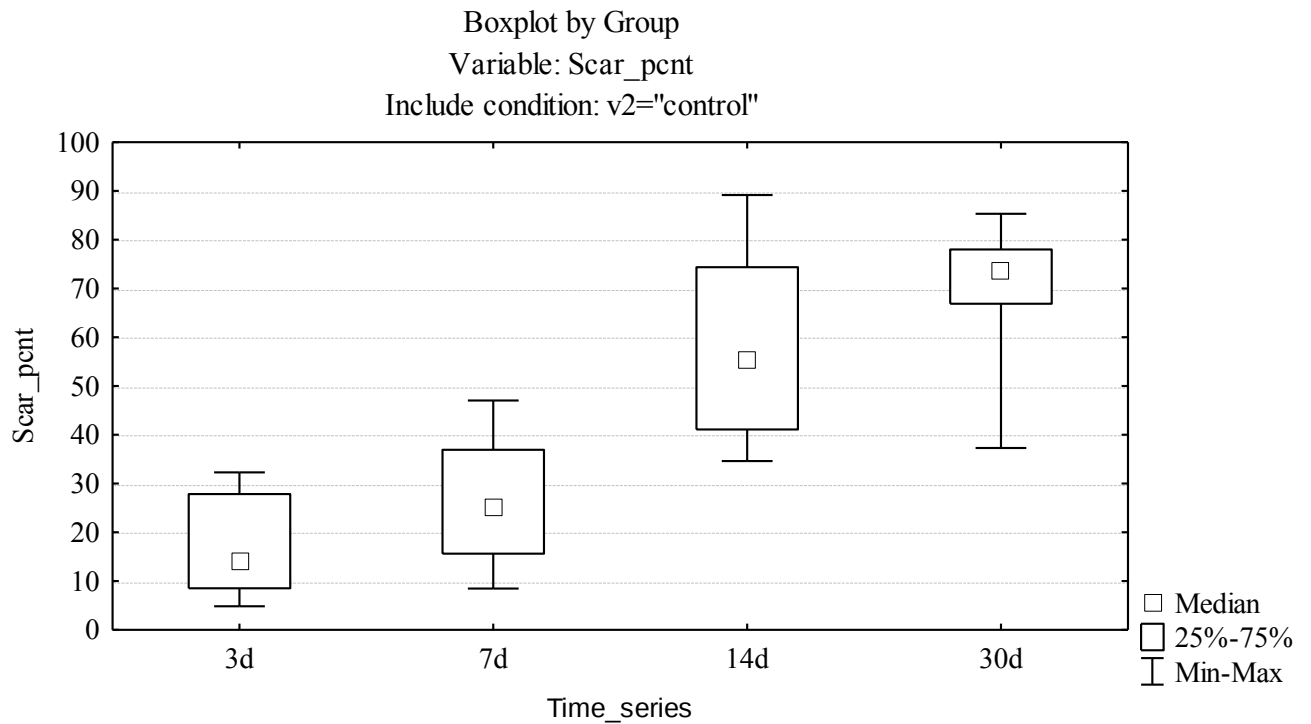


Рисунок 21 – Контрольная группа, динамика количества коллагеновых волокон в зоне формирования послеоперационного рубца

При этом в интактной дерме изменений не наблюдалось (Рисунок 22).

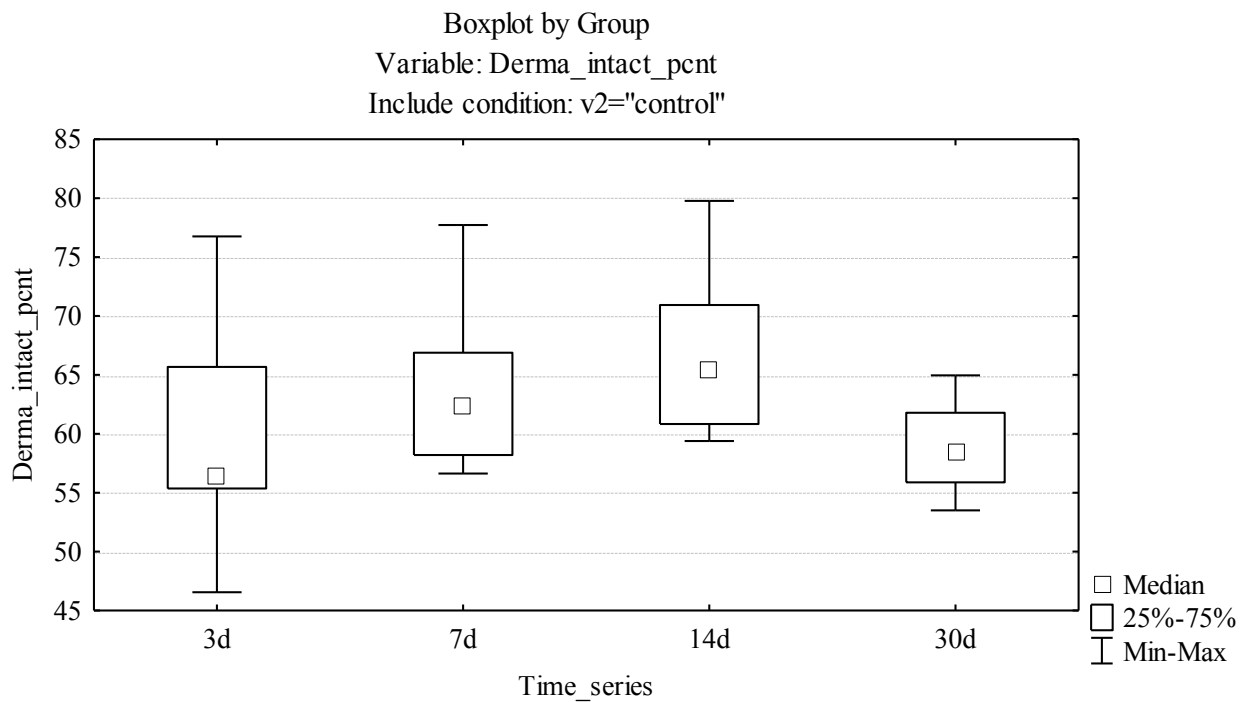


Рисунок 22 – Контрольная группа, динамика количества коллагеновых волокон в интактной дерме

В дерме рядом с травматическим повреждением плотность коллагеновых волокон статистически значимо повышалась на 14-е сутки ($p = 0,029$) (Рисунок 23).

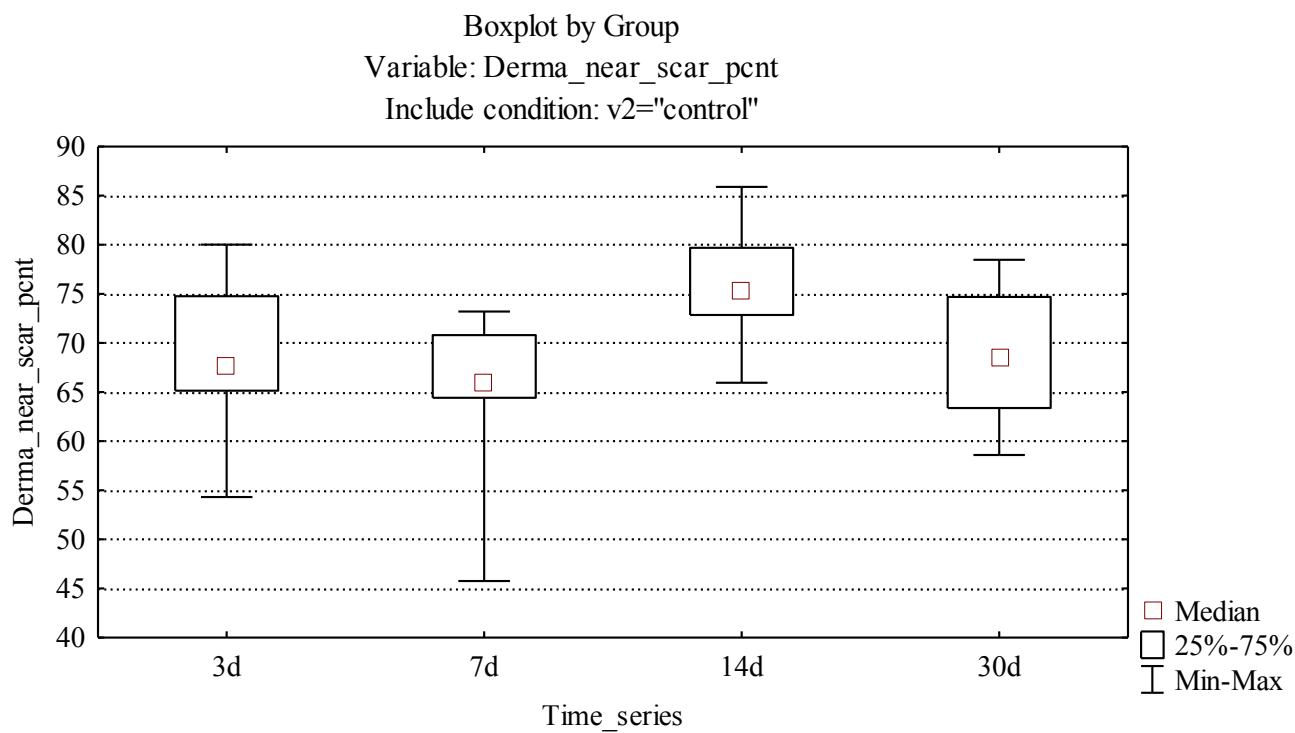


Рисунок 23 – Контрольная группа, динамика количества коллагеновых волокон в зоне, прилегающей к зоне формирования послеоперационного рубца

Локальное применение блокатора p38 SB 203580 приводило к существенному снижению коллагенообразования в зоне формирующегося послеоперационного рубца. В течение всего срока наблюдения – от 3-х до 30-х суток отмечалось статистически значимое снижение коллагенообразования в сравнении с группой контроля (Таблица 2).

Таблица 2 – Количество коллагеновых волокон в зоне формирующегося рубца при подавлении активности p38 MAP-киназы

Срок	Контрольная группа			Введение SB 203580			<i>Z</i>	<i>p</i>
	Me	25% кв.	75% кв.	Me	25% кв.	75% кв.		
3-и сутки	11,57	8,53	27,85	4,53	0,89	9,81	2,49	0,011000
7-е сутки	25,21	15,61	36,92	1,78	1,09	2,80	5,20	0,000001
14-е сутки	55,41	41,10	74,38	31,54	23,15	40,24	4,49	0,000007
30-е сутки	73,54	66,87	78,01	43,60	41,05	60,15	3,14	0,001700

Так, на 3-и сутки коллагенообразование в области раны практически отсутствовало (Рисунок 24).

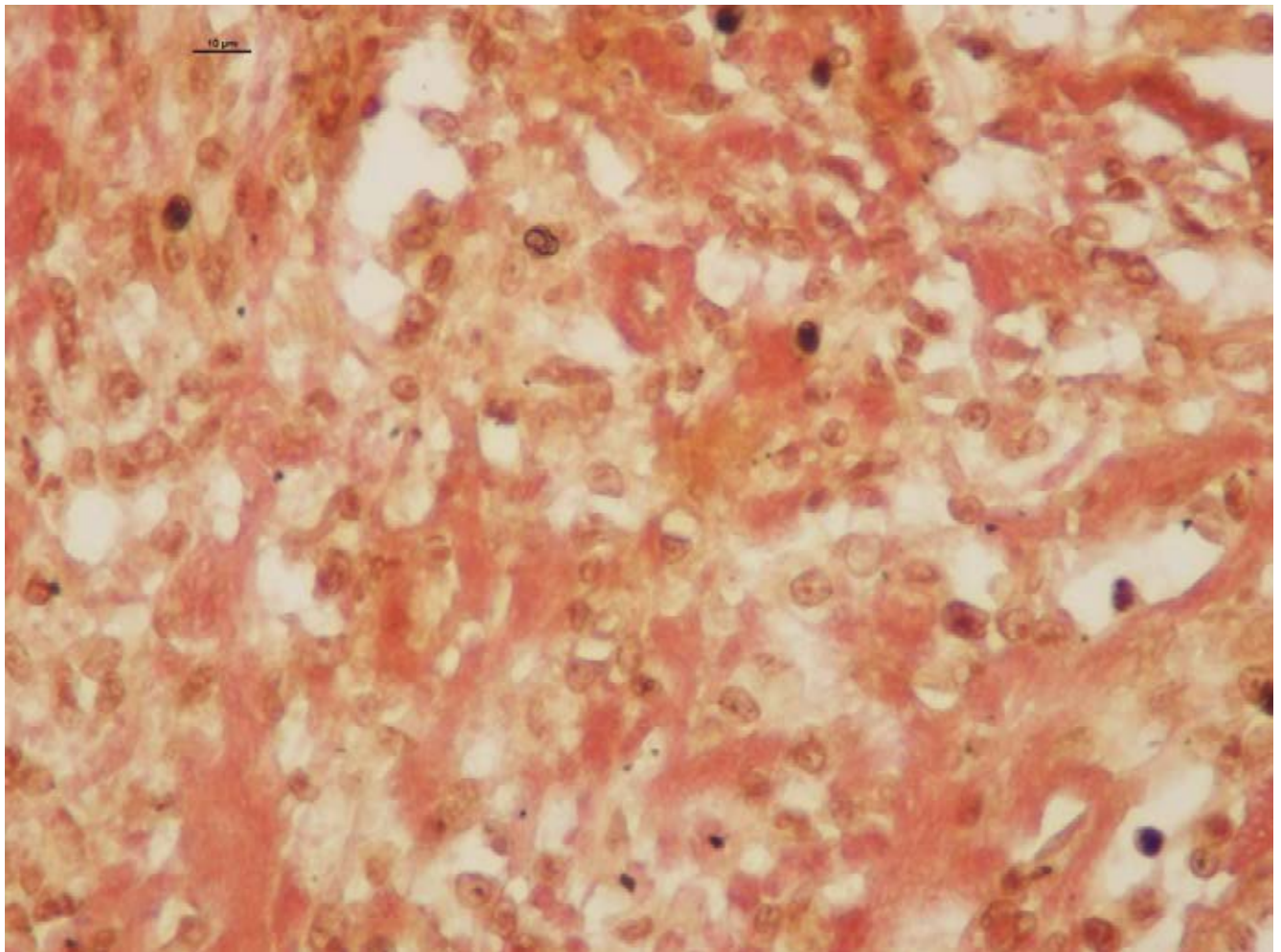


Рисунок 24 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 3-и сутки.
Резко сниженное коллагенообразование в области раны. Окраска по Ван Гизону

В итоге к концу наблюдения (30-е сутки) у животных с введением SB 203580 количество коллагеновых волокон в ране было практически в 2 раза ниже, чем в контроле (43,6 [41,05–60,15] в группе SB 203580, по сравнению с 73,54 [66,87–78,01] в группе контроля; $p = 0,0017$) (Рисунок 25).

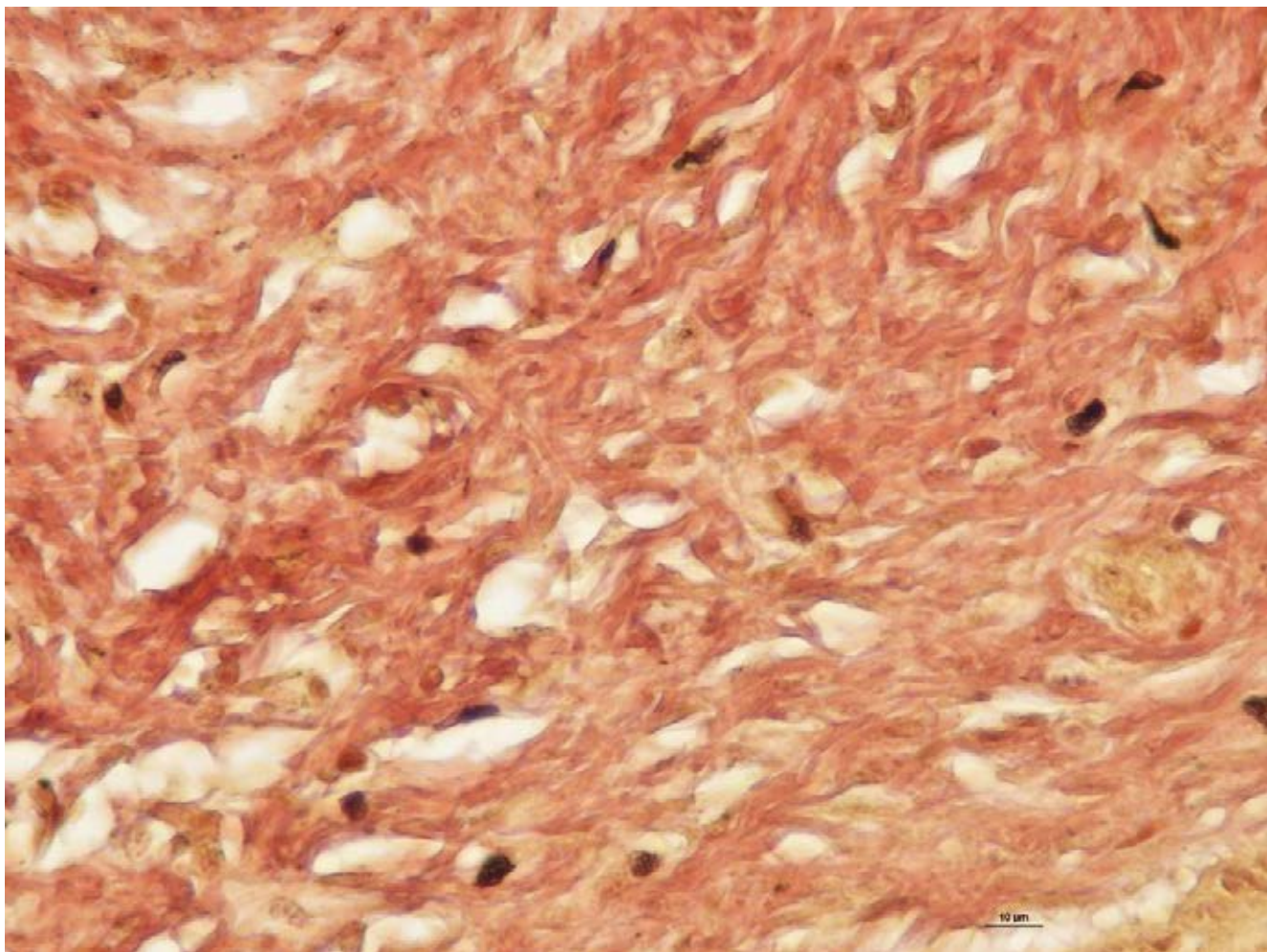


Рисунок 25 – Группа с блокадой р38 MAP-киназного каскада, 30-е сутки.
Низкая плотность коллагеновых волокон в области послеоперационного рубца.
Окраска по Ван Гизону

Указанная динамика синтеза коллагена в зоне образования послеоперационного рубца представлена на рисунке 26.

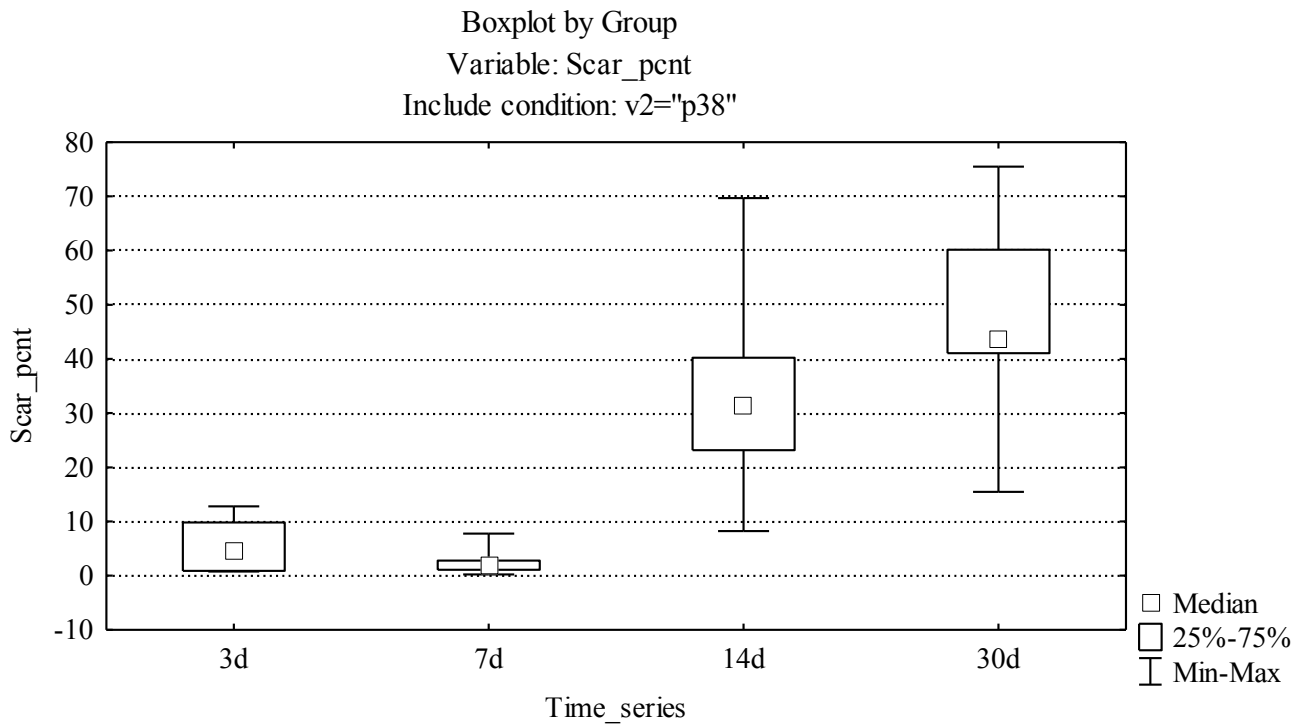


Рисунок 26 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, динамика количества коллагеновых волокон в зоне формирования послеоперационного рубца

В интактной дерме количество коллагена при применении блокатора p38 в сроки 3, 7 и 14 суток статистически значимо отставало от такового в контрольной группе, к 30-м суткам различия нивелировались (Таблица 3, Рисунок 27).

Таблица 3 – Количество коллагеновых волокон в интактной дерме

Срок	Контрольная группа			Введение SB 203580			Z	P
	Me	25% кв.	75% кв.	Me	25% кв.	75% кв.		
3-и сутки	56,42	55,36	65,68	47,24	46,04	47,63	2,81	0,003
7-е сутки	62,37	58,20	66,88	49,52	35,07	62,27	1,89	0,062
14-е сутки	65,47	60,83	70,94	55,74	49,05	66,63	2,70	0,005
30-е сутки	58,44	55,88	61,79	59,20	51,36	63,46	0,19	0,89

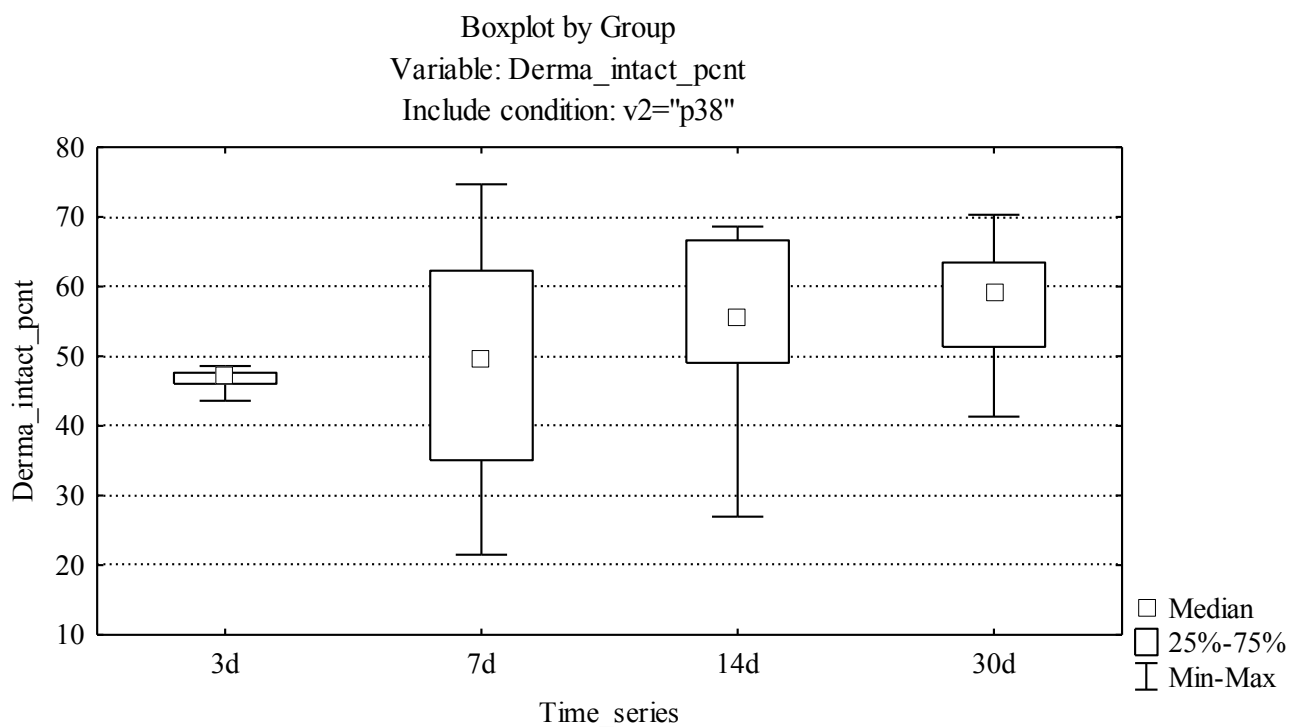


Рисунок 27 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, динамика количества коллагеновых волокон в интактной дерме

В зоне, прилегающей к зоне травматического повреждения, у животных группы с применением блокатора p38 наблюдалось нарастание количества коллагена в динамике от 3-х к 30-м суткам (Рисунок 28).

При этом на 3-и и 14-е сутки показатель был статистически значимо снижен, по сравнению с контрольной группой. Различия нивелировались к 30-м суткам (Таблица 4).

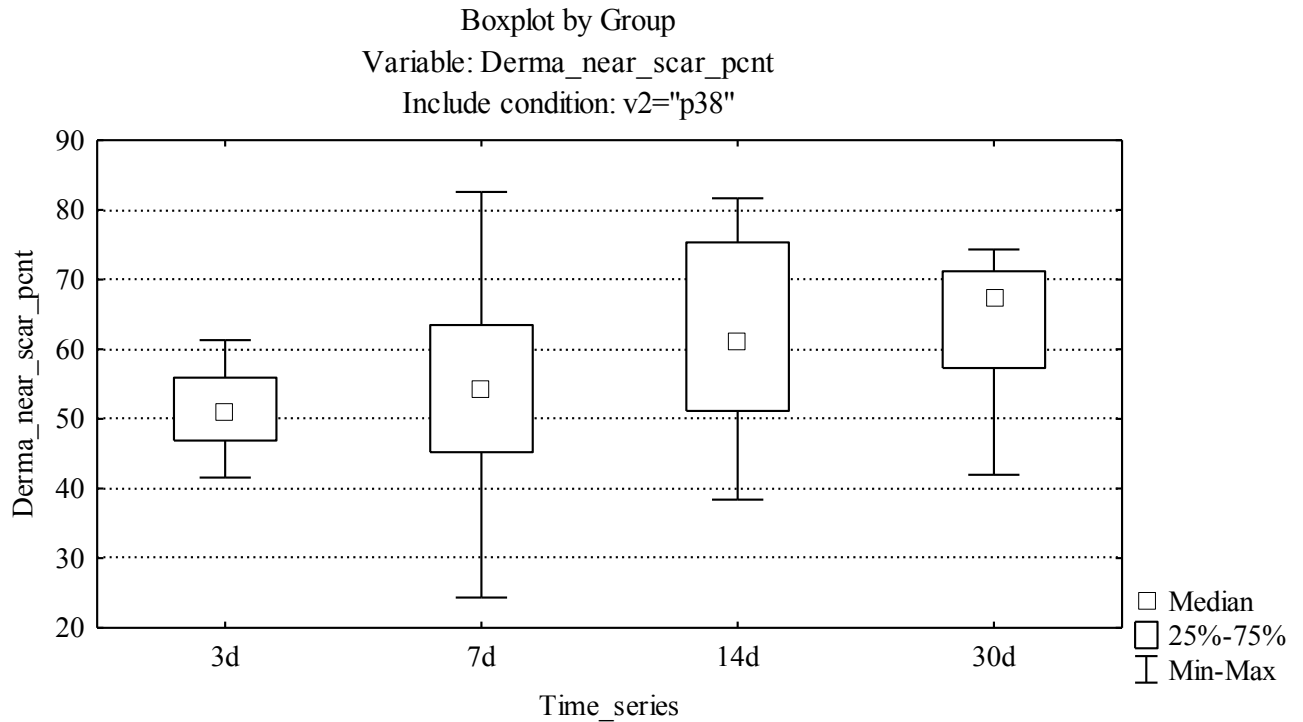


Рисунок 28 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, динамика количества коллагеновых волокон в зоне, прилегающей к зоне формирования рубца

Таблица 4 – Количество коллагеновых волокон в дерме в зоне, прилегающей к зоне травматического повреждения

Срок	Контрольная группа			Введение SB 203580			Z	P
	Me	25% кв.	75% кв.	Me	25% кв.	75% кв.		
3-и сутки	67,67	65,14	74,76	51,00	46,89	55,92	3,46	0,00014
7-е сутки	65,93	64,43	70,81	54,33	45,23	63,47	1,69	0,097
14-е сутки	75,33	72,85	79,70	61,08	51,14	75,33	2,88	0,003
30-е сутки	68,44	63,38	74,70	67,51	57,31	71,19	0,86	0,425

Таким образом, локальное подавление активности p38 MAP-киназы снижает синтетическую активность фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца.

3.4 Влияние блокатора p38 MAP-киназы на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца

Нами изучено влияние локального введения ингибитора p38 MAPK на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца. Для этого оценивалась экспрессия в зоне повреждения CD45 как маркера клеток костномозгового происхождения, CD34 – как маркера лейкоцитарных клеток, MMP9 – матриксной металлопротеазы 9, актина и эндоглина.

При изучении процесса репарации в области послеоперационного рубца у животных контрольной группы установлено, что уже с начала фибробластической фазы воспаления фибробласты (на 3-и сутки) интенсивно экспрессировали CD34+, к 7-м суткам только небольшое число клеток имели слабое специфическое окрашивание. Позднее специфическое окрашивание зарегистрировать не удалось (Рисунки 29, 30).

Аналогичный процесс зарегистрирован при локальном введении блокатора p38 MAPK (Рисунки 31, 32).

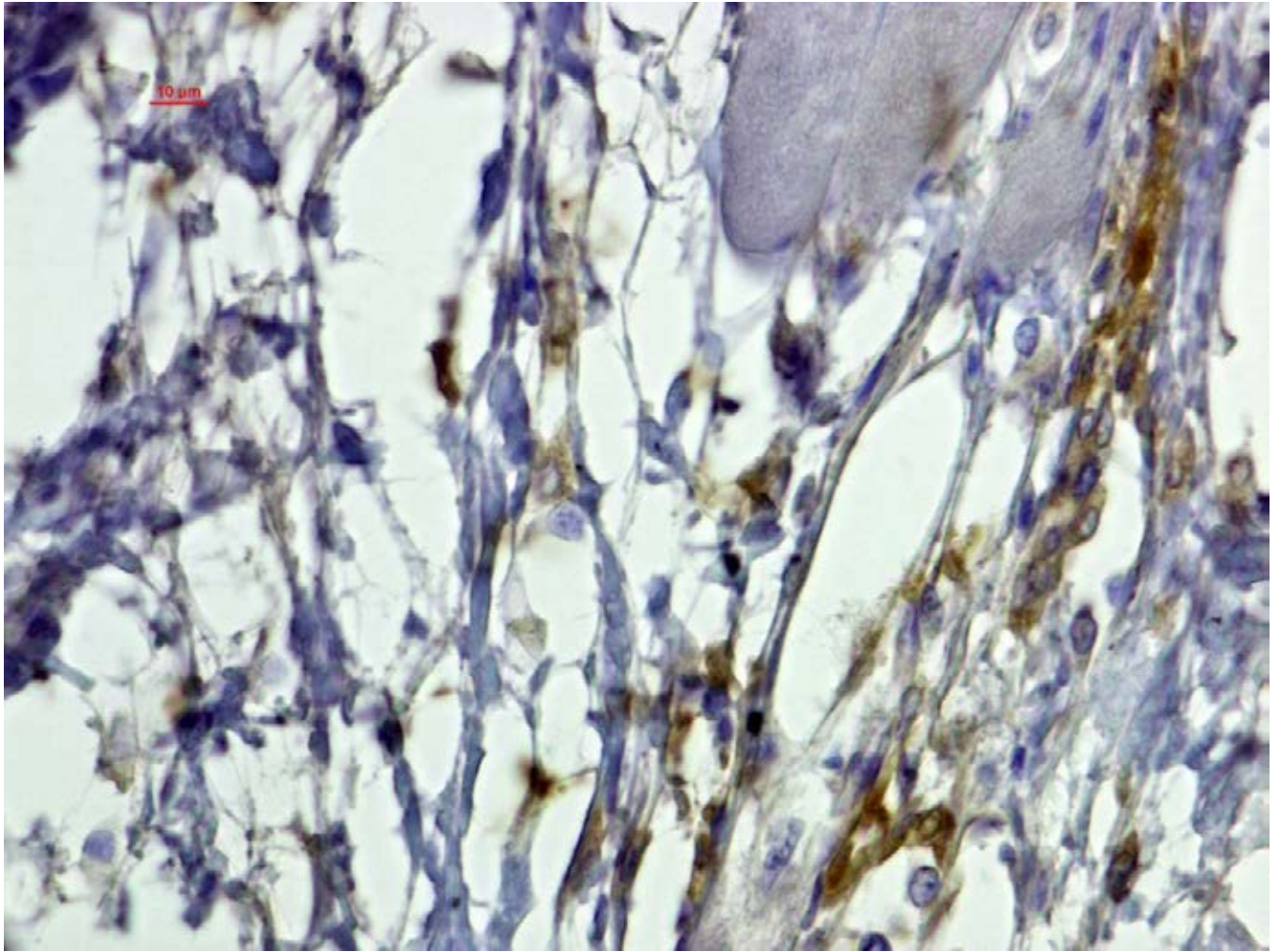


Рисунок 29 – Контрольная группа, 3-и сутки. Интенсивная экспрессия CD34+ маркеров клетками в зоне образования соединительной ткани.

Иммуногистохимия, первичные антитела – CD34 (Santa cruz), 1:300, докрашивание гематоксилином

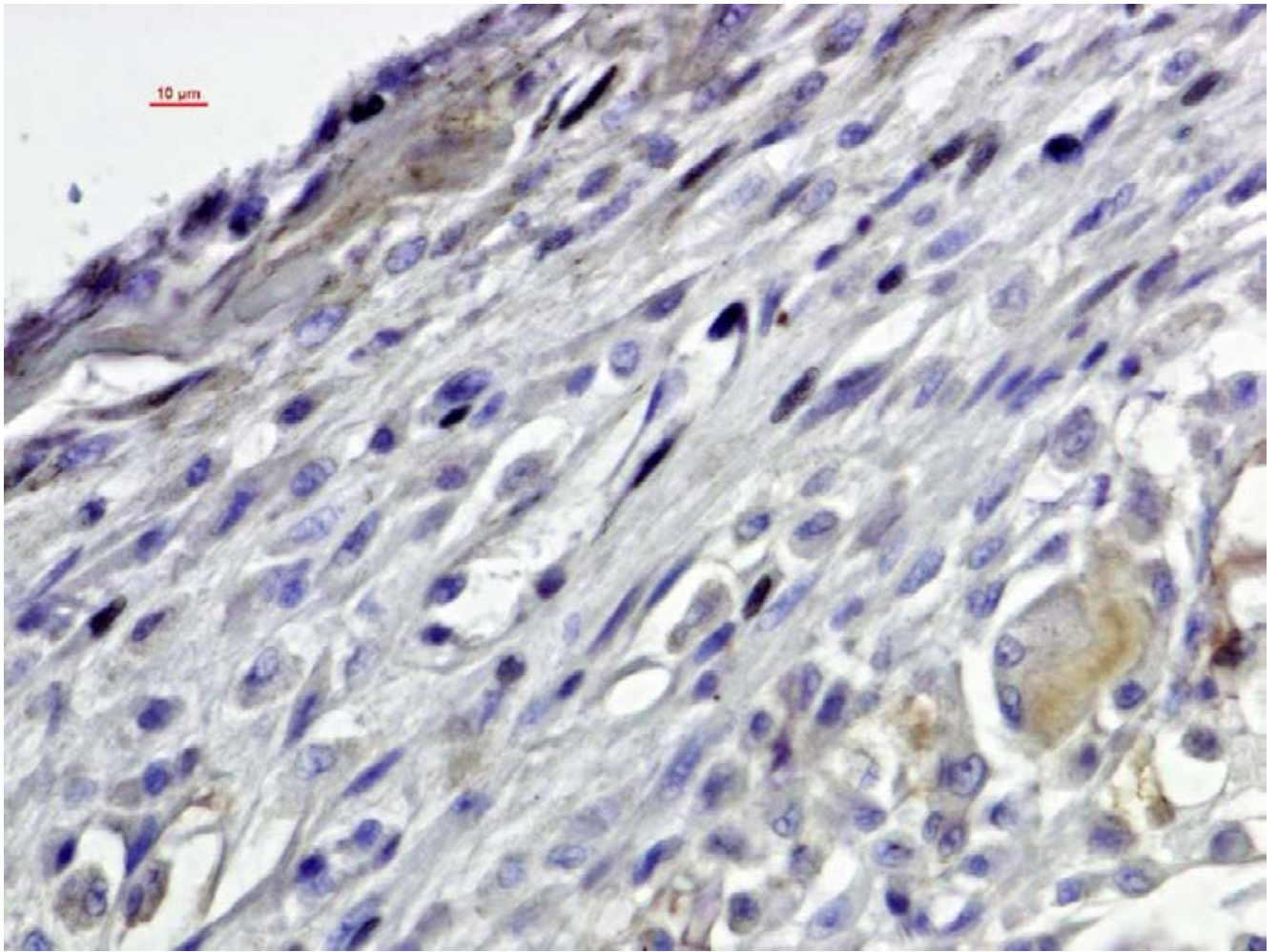


Рисунок 30 – Контрольная группа, 7-е сутки. Единичные фибробласты, экспрессирующие CD34+ в зоне образования соединительной ткани. Иммуногистохимия, первичные антитела – CD34 (Santa cruz), 1:300, докрашивание гематоксилином

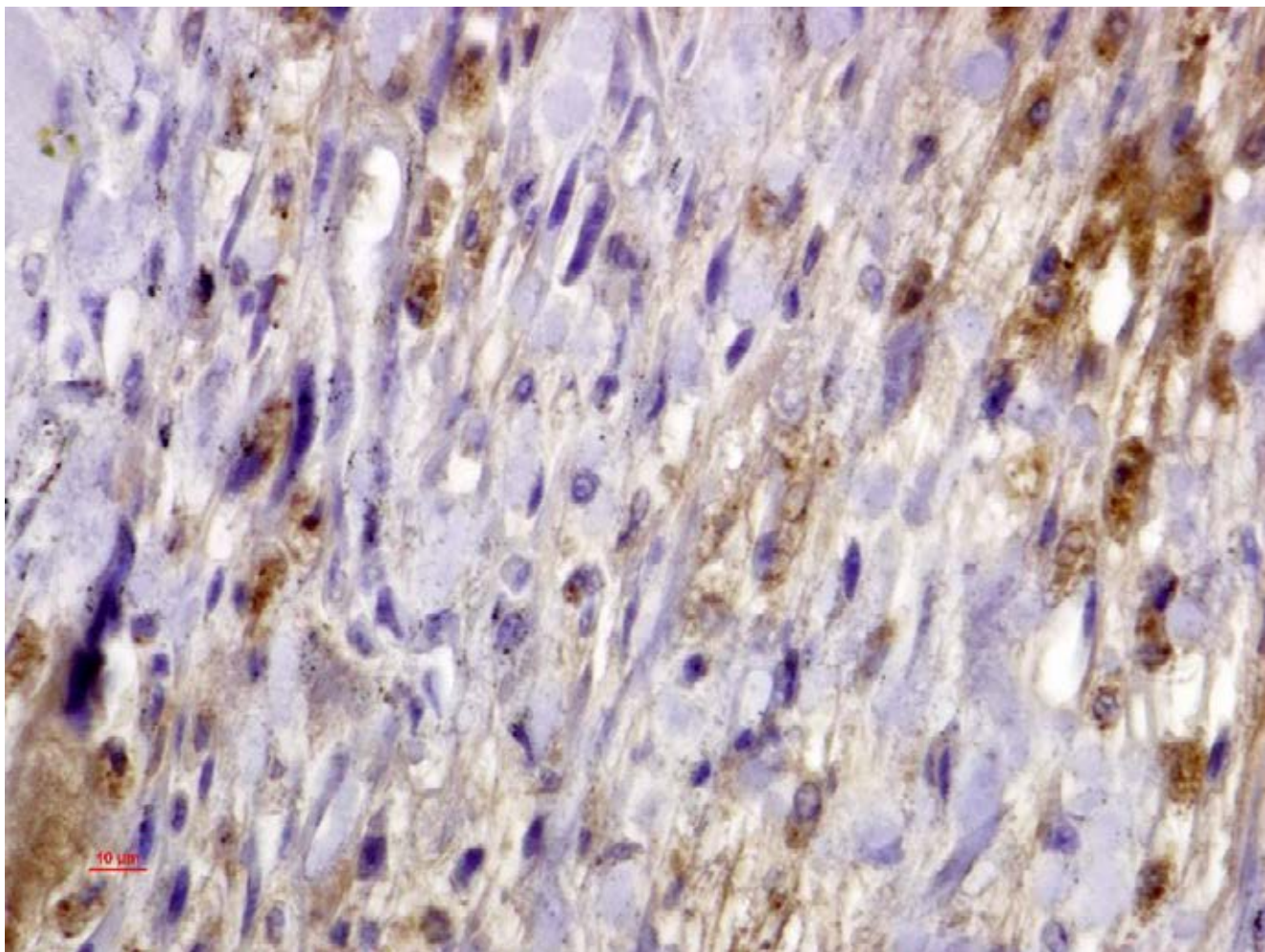


Рисунок 31 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 3-и сутки.
Интенсивная экспрессия CD34+ маркеров клетками в зоне образования рубца.
Иммуногистохимия, первичные антитела – CD34, (Santa cruz),
докрашивание гематоксилином

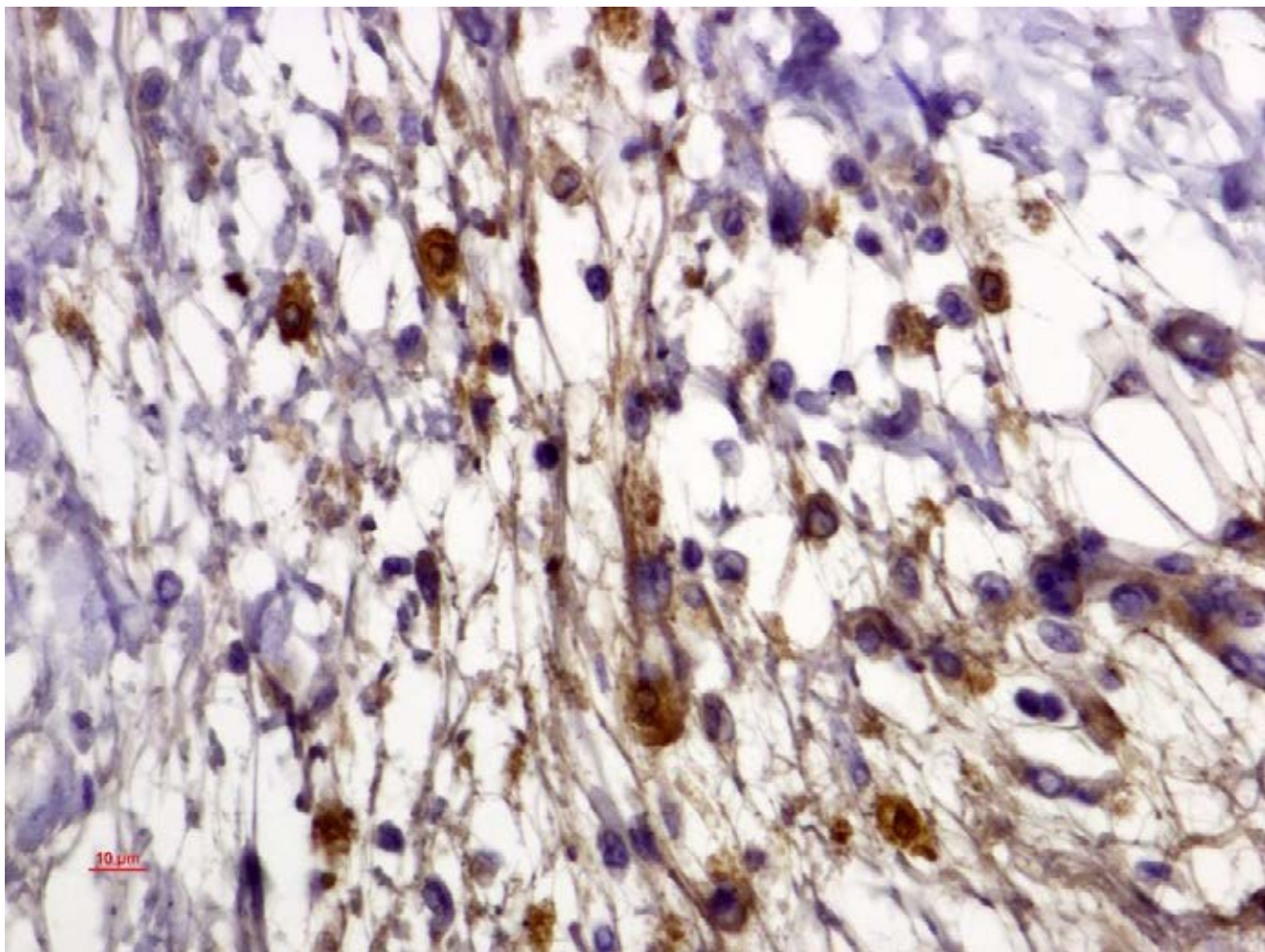


Рисунок 32 – Группа с блокадой р38 MAP-киназного каскада, 7-е сутки.
Экспрессия CD34+ маркеров клетками в зоне образования соединительной ткани.
Иммуногистохимия, первичные антитела – CD34 (Santa cruz),
докрашивание гематоксилином

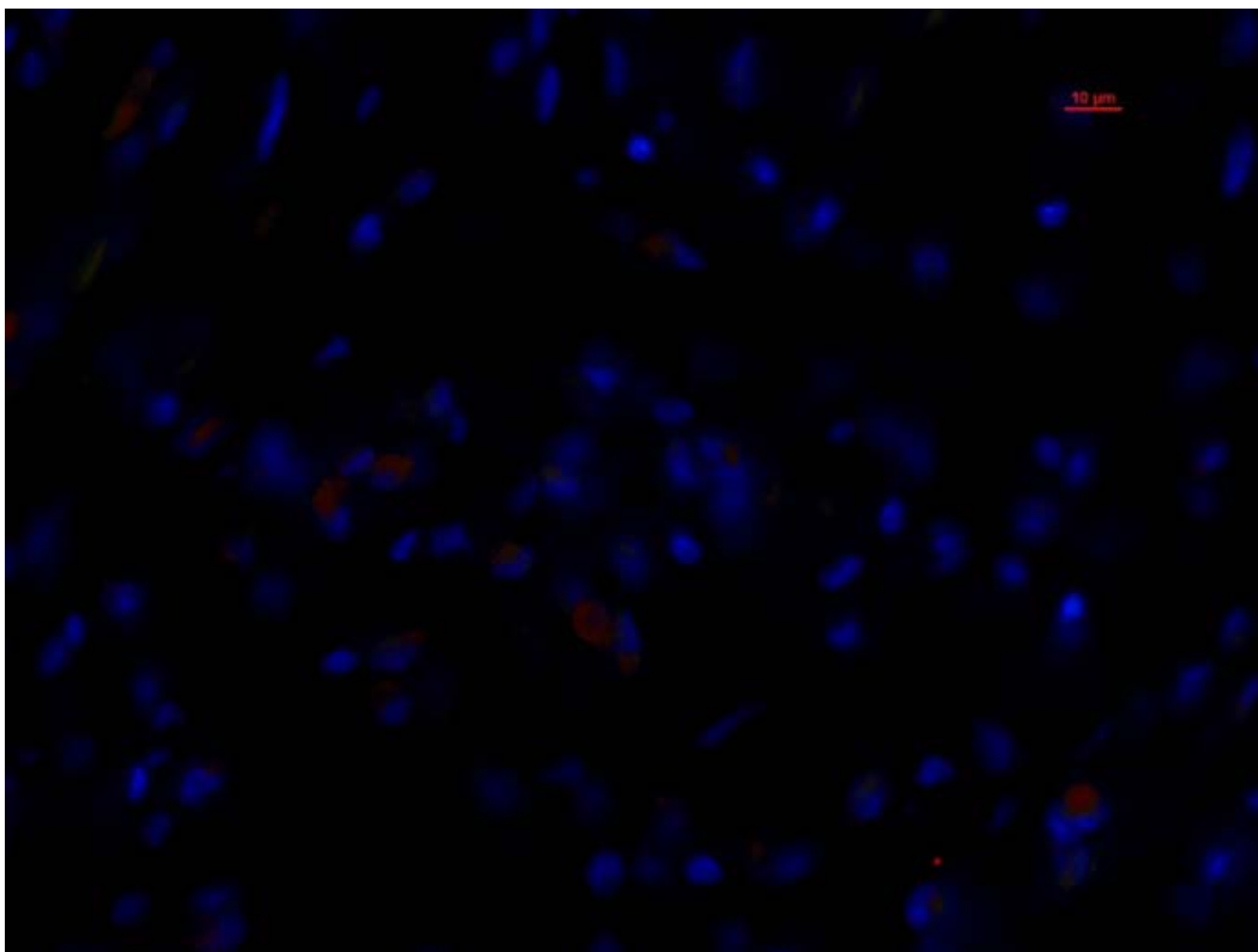


Рисунок 33 – Контрольная группа, 7-е сутки. CD34+CD45+ клетки в зоне образования послеоперационного рубца. Иммунофлюоресценция, первичные антитела CD34 (Santa cruz), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488, первичные антитела CD45 (Santa cruz), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 568, докрашивание ядер Dapi

Наличие в зоне формирования послеоперационного рубца прогениторных клеток фибробластического ряда, имеющих фенотип CD34+CD45+, у животных контрольной группы зарегистрировано только в срок 7 суток (Рисунок 33). В группе с введением блокатора p38 такое сочетание маркеров не зарегистрировано в течение всего срока наблюдения.

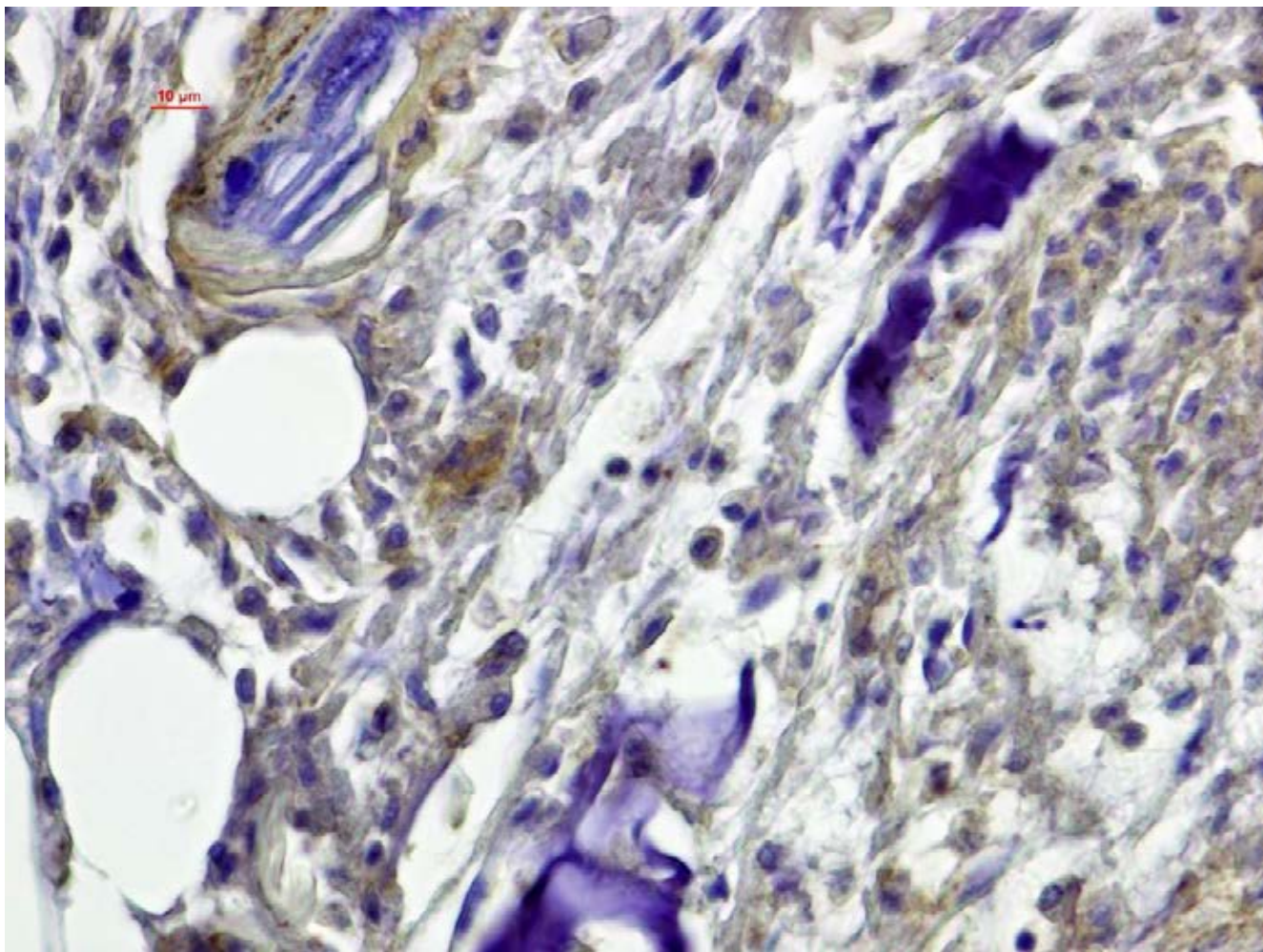


Рисунок 34 – Контрольная группа, 3-и сутки. Миофибробласты
в зоне формирования послеоперационного рубца.

Иммуногистохимия, первичные антитела к актину (Epitomics),
докрашивание гематоксилином

Выявление в зоне формирования рубца миофибробластов определялось по наличию положительной окраски на актин. Установлено, что как у животных контрольной группы, так и при введении блокатора p38 MAPK окрашивалось только небольшое число клеток на 3-и и 7-е сутки раневого процесса (Рисунки 34–37).

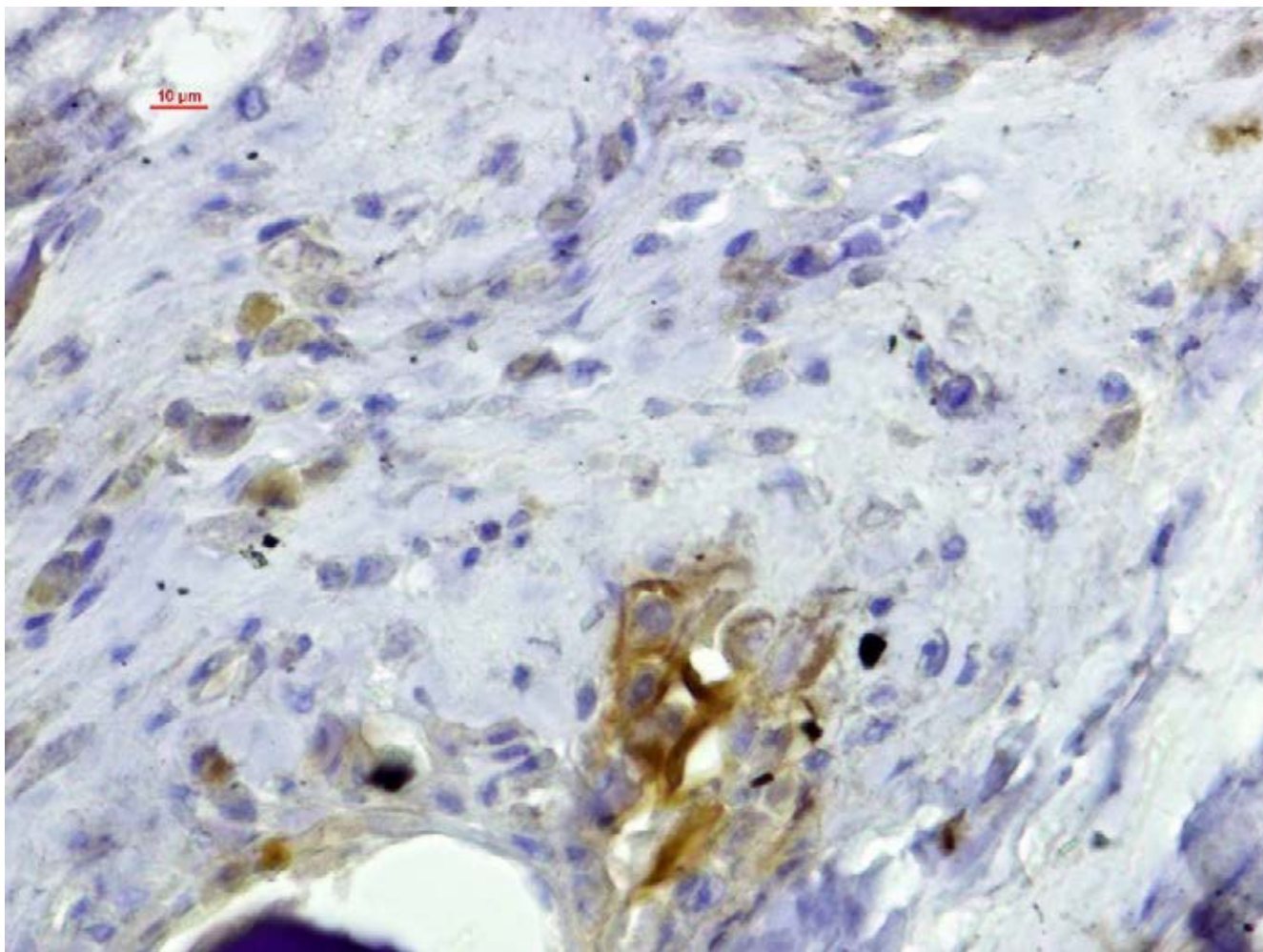


Рисунок 35 – Контрольная группа, 7-е сутки. Миофибробласты в зоне образования рубца. Иммуногистохимия, первичные антитела к актину (Epitomics), докрашивание гематоксилином

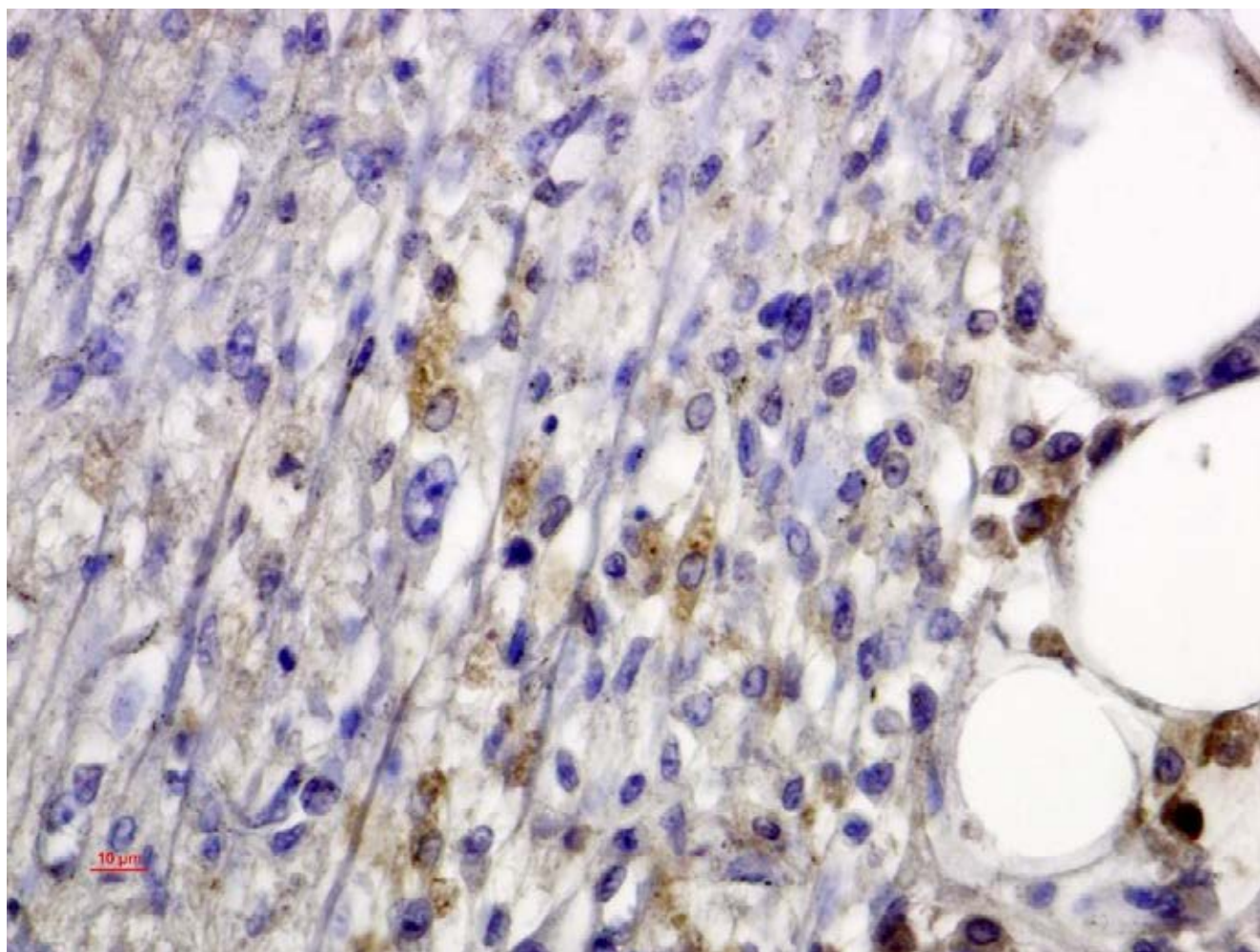


Рисунок 36 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 3-и сутки.
Единичные миофибробласты в зоне образования соединительной ткани.

Иммуногистохимия, первичные антитела к актину (Epitomics),
докрашивание гематоксилином

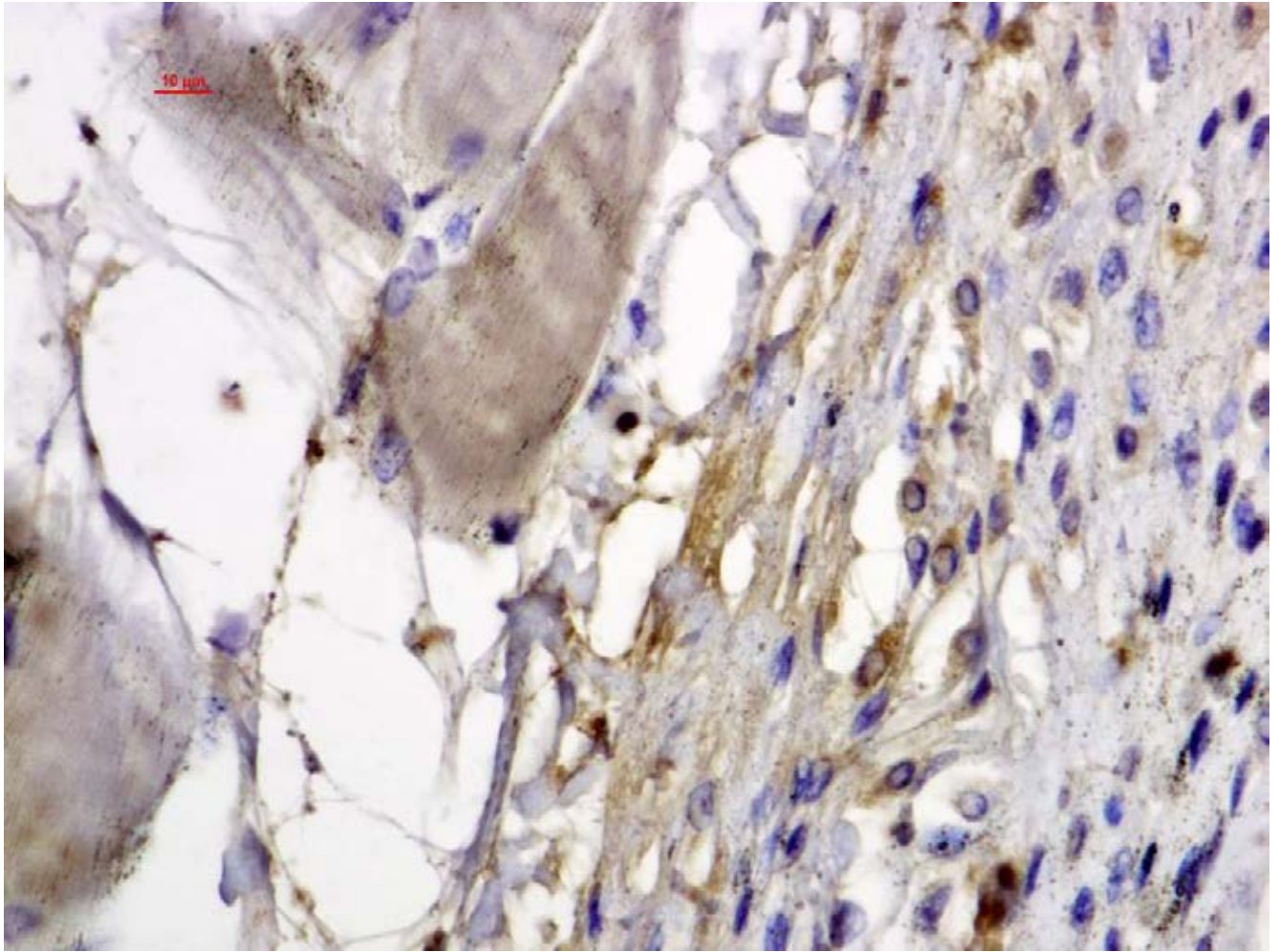


Рисунок 37 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 7-е сутки.

Миофибробласты в зоне образования соединительной ткани.

Иммуногистохимия, первичные антитела к актину (Epitomics),
докрашивание гематоксилином

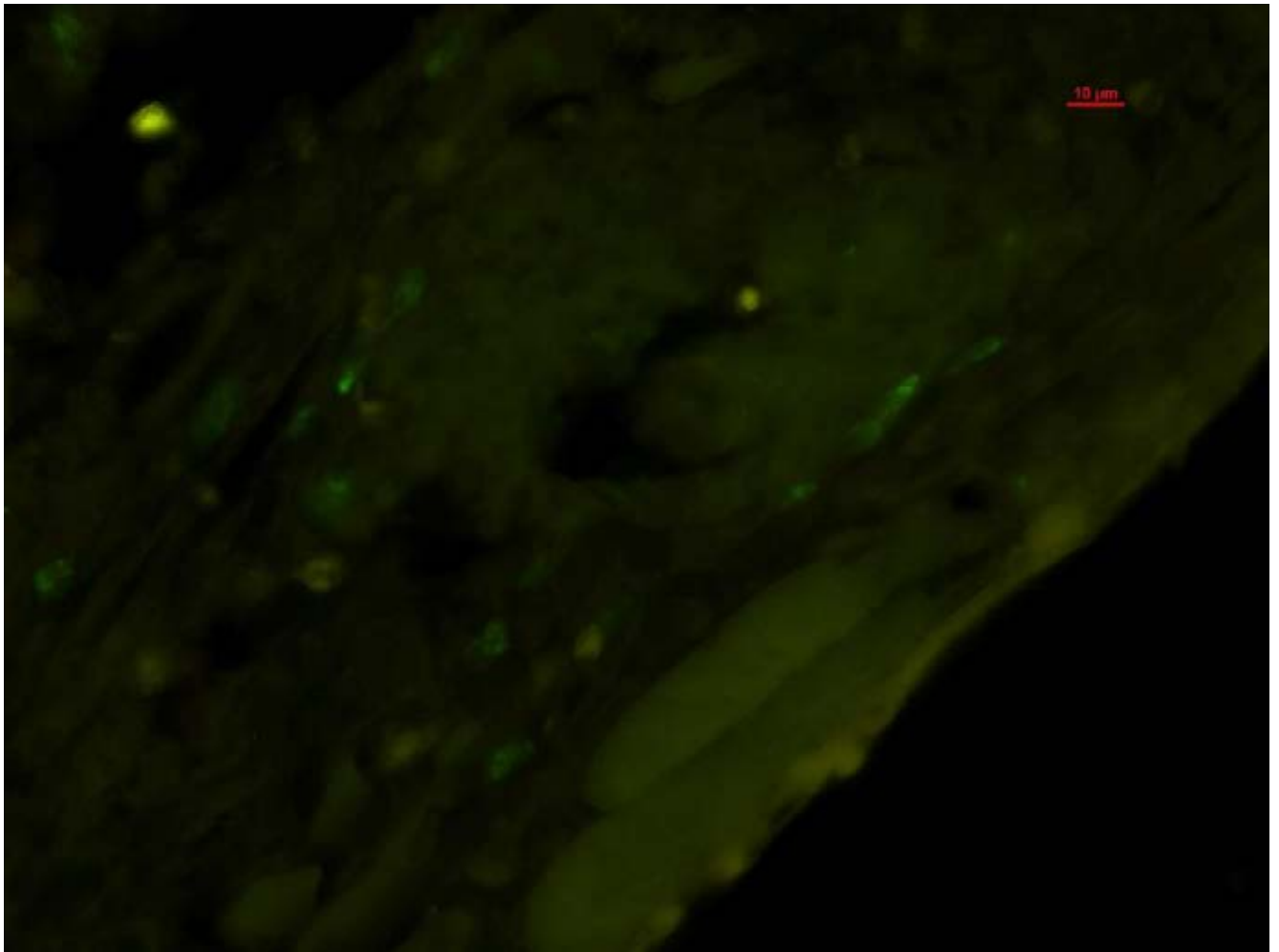


Рисунок 38 – Контрольная группа, 7-е сутки. Единичные фиброкласты в зоне формирования послеоперационного рубца. Иммунофлюоресценция, первичные антитела к MMP9 (Epitomics), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488

Наличие в зоне формирования рубца фиброкластов выявляли по специфическому окрашиванию на MMP9 клеток фибробластического ряда. У животных контрольной группы такие клетки в зоне рубца обнаружены только на 7-е сутки (Рисунок 38).

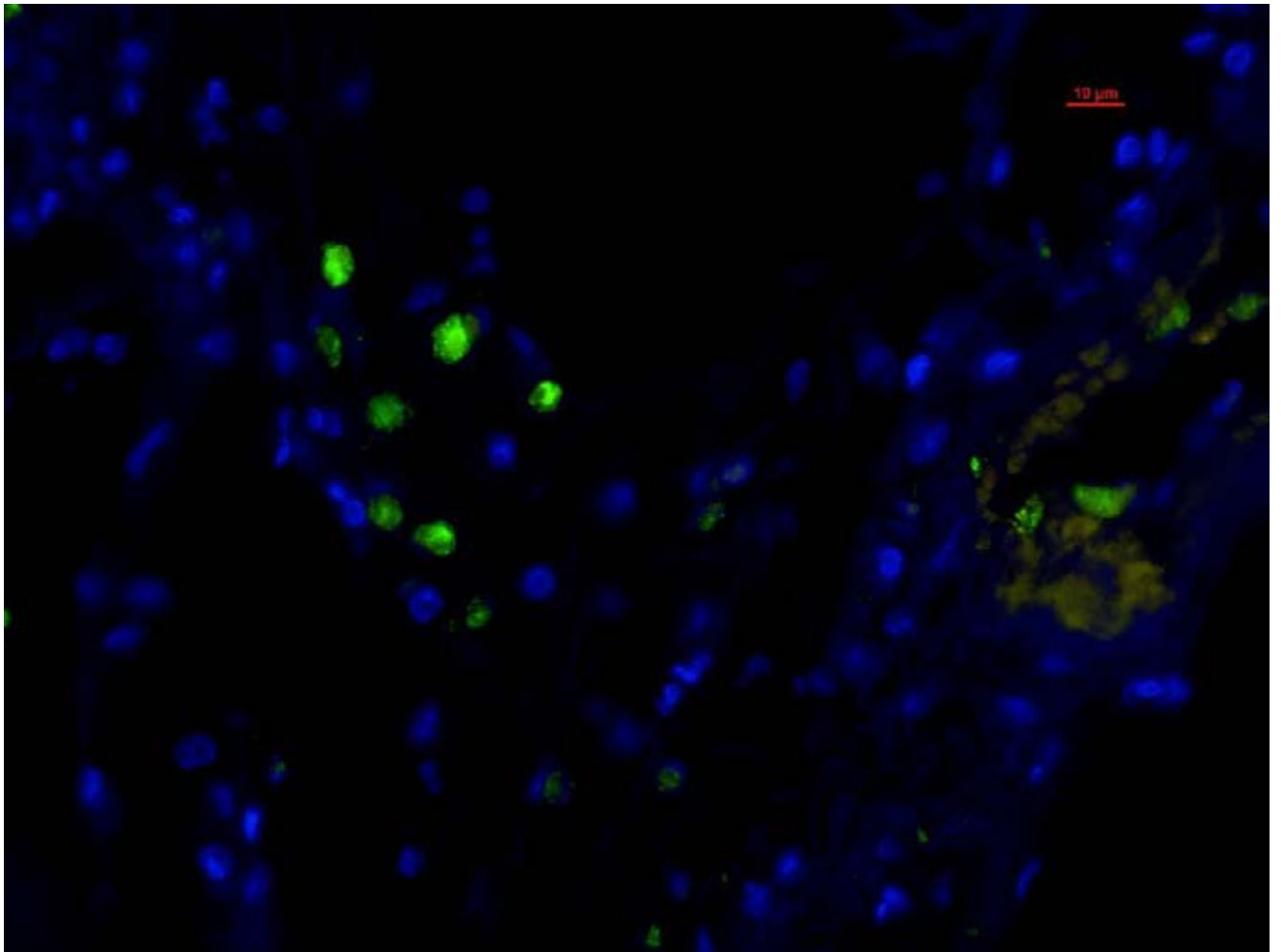


Рисунок 39 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 3-и сутки. Ярко светящиеся фиброкласты, экспрессирующие MMP9 в зоне образования послеоперационного рубца. Иммунофлюоресценция, первичные антитела к MMP9 (Epitomics), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488, докрашивание ядер Dapi

В группе с применением блокатора p38 клетки с такими маркерами фиксировались на 3-и и 7-е сутки после моделирования послеоперационного рубца и характеризовались высокой интенсивностью специфического свечения (Рисунок 39).

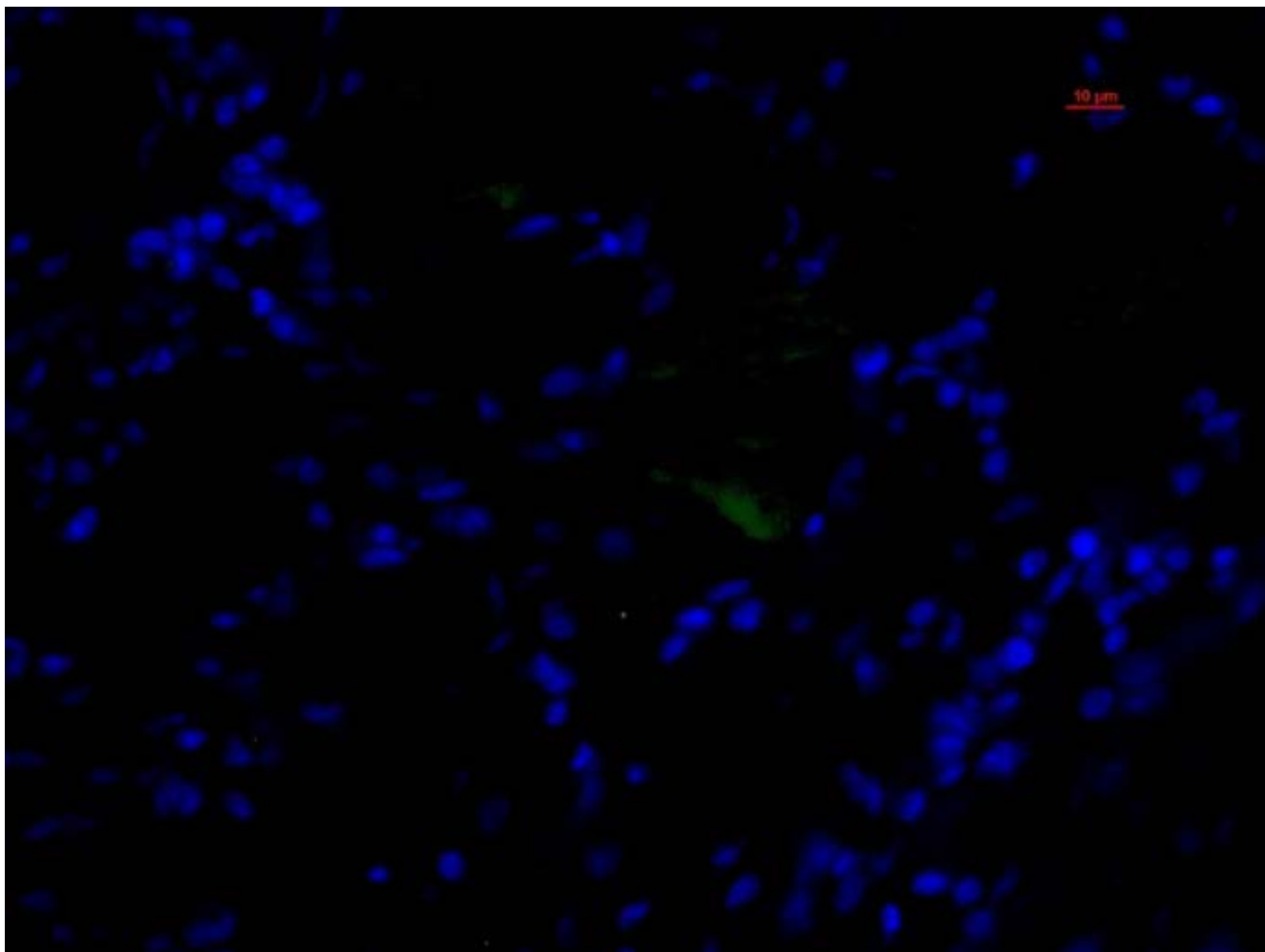


Рисунок 40 – Контрольная группа, 7-е сутки. Отсутствие окрашивания на эндоглин в области послеоперационного рубца. Иммунофлюоресценция, первичные антитела к эндоглину (Santa cruz), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488, докрашивание ядер Dapi

Эндоглин является мембранным гликопротеидом. Применение блокатора p38 MAPK изменяло экспрессию эндоглина. Так, у животных контрольной группы клетки фибробластического ряда в течение всего срока наблюдения не экспрессировали эндоглин (Рисунок 40).

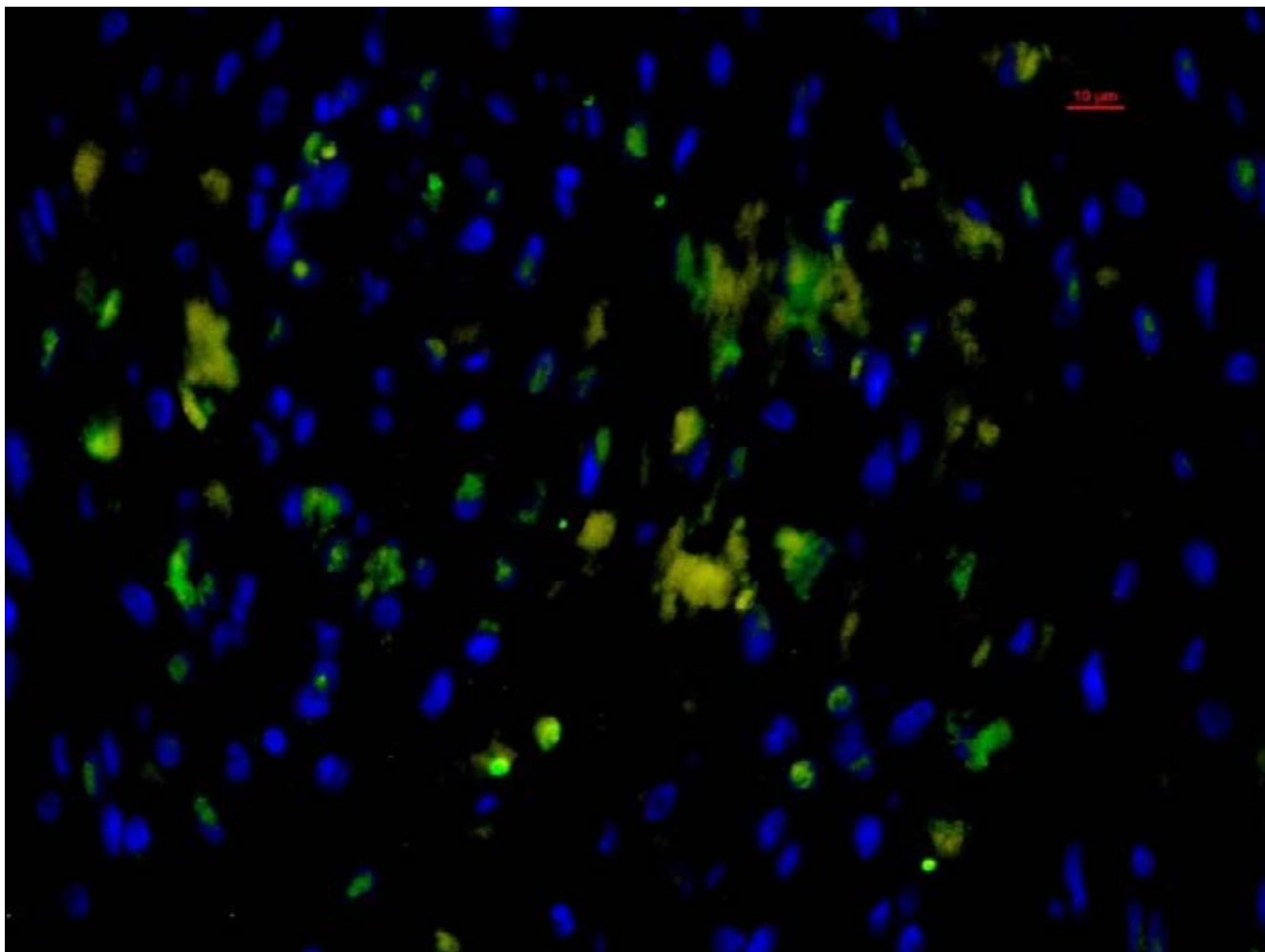


Рисунок 41 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 7-е сутки.

Окрашивание на эндоглин в зоне послеоперационного рубца.

Иммунофлюоресценция, первичные антитела к эндоглину (Santa cruz), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488, докрасивание ядер Dapi

При применении блокатора p38 отмечалась гиперэкспрессия фибробластами эндоглина с 7-х по 30-е сутки (Рисунок 41). Как известно, гиперэкспрессия эндоглина тесно связана с перестройкой внеклеточного матрикса, изменением морфологии фибробластов [90].

Таким образом, локальное введение блокатора p38 MAPK снижает привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону формирования послеоперационного рубца, повышает фиброкластическую активность, приводит к гиперэкспрессии эндоглина на поверхности фибробластов, что косвенно свидетельствует об активной перестройке внеклеточного матрикса.

3.5 Изучение ультраструктуры клеток фибробластического ряда при подавлении активности p38 MAP-киназы

Изучение влияния блокатора p38 MAPK на состояние фибробластов в очаге образования соединительной ткани показало, что у животных при применении блокатора p38 резко снижается количество фибробластов в зоне формирующегося послеоперационного рубца, фибробласты располагаются одиночно. При этом фибробласты не имеют морфологических признаков активации – ядрышки не выражены, слабо развита эндоплазматическая сеть (Рисунок 42).

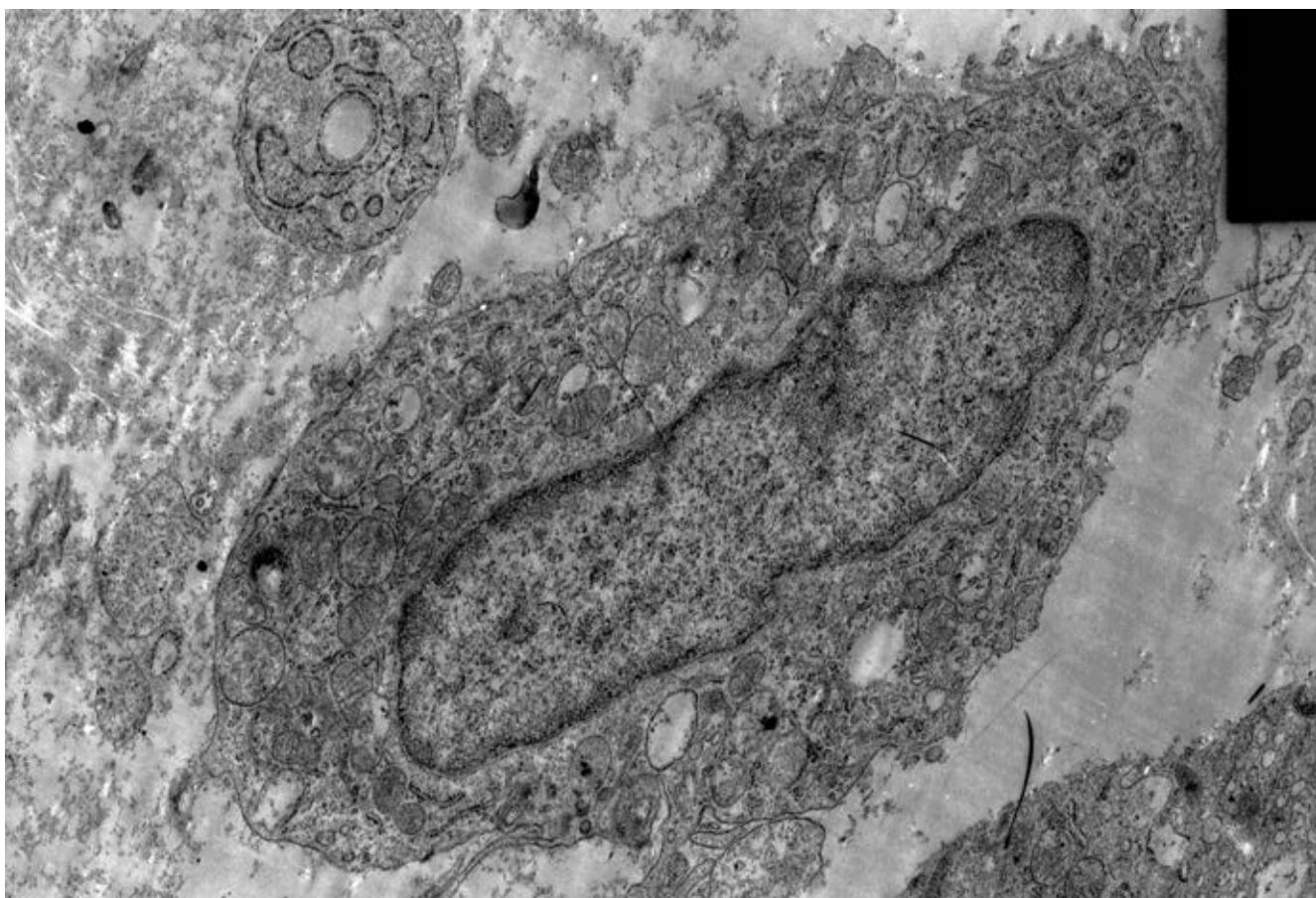


Рисунок 42 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 7-е сутки.

Одиночно лежащий фибробласт в области роста
молодой соединительной ткани, отсутствие признаков активации,
отсутствие ядрышка, слабо развитая эндоплазматическая сеть.

Электроннограмма. Ув. 6900

Данная картина наблюдается весь период фибробластической фазы воспаления, начиная с 3-х суток. Отражением низкой плотности клеток в очаге образования соединительной ткани и их невысокой функциональной активности является низкая плотность формирующегося коллагена. При этом коллагеновые волокна рыхлые, неплотно упакованные, в отличие от контрольной группы, не образуют больших полей (Рисунки 43, 44).

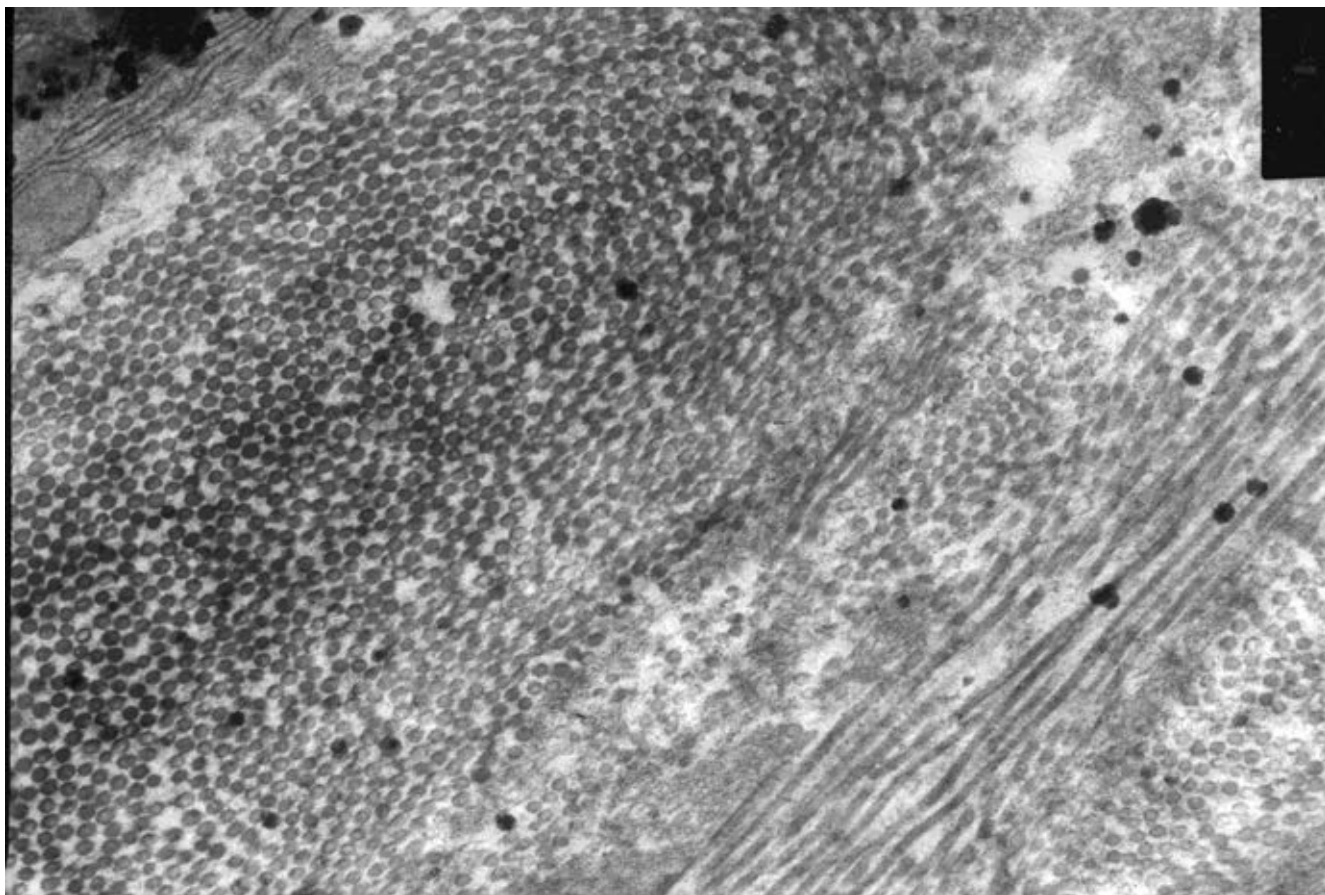


Рисунок 43 – Контрольная группа, 7-е сутки.

Плотно упакованные волокна коллагена в области формирующегося рубца.

Электроннограмма. Ув. 14500

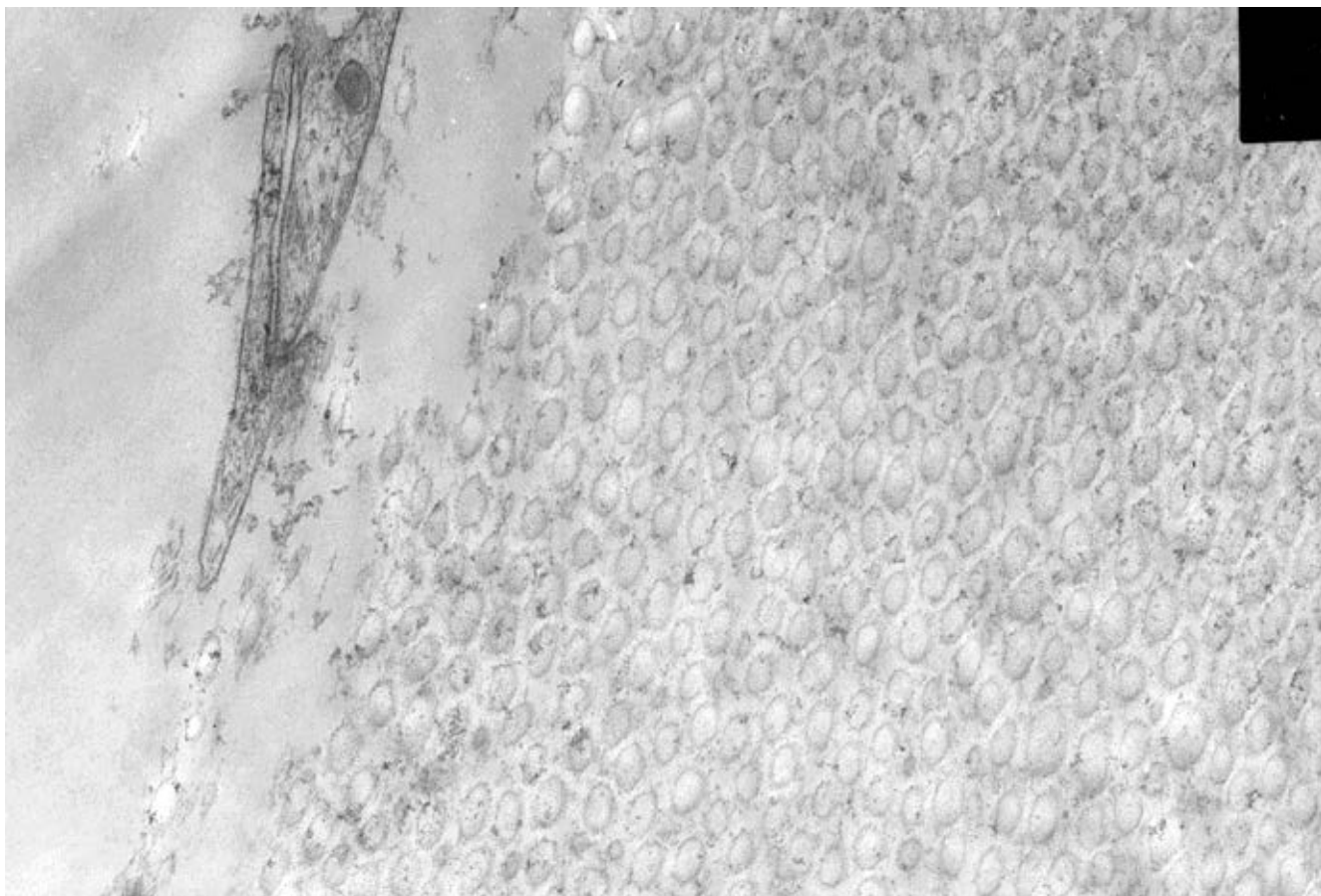


Рисунок 44 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 7-е сутки.

Рыхлые волокна коллагена в области формирующегося рубца.

Электроннограмма. Ув. 24000

При электронно-микроскопическом исследовании нами отмечена деструкция митохондрий, их отёк, набухание крист на 3-и и 7-е сутки после моделирования раневого процесса при искусственном подавлении активности p38 MAPK-каскада. При этом у животных контрольной группы митохондрии были сохранены (Рисунки 45, 46, 47).

По-видимому, блокада каскада запускает апоптоз клеток-фибробластов, реализующийся через нарушение энергетического обмена внутри клетки. Данный эффект нами описан впервые.

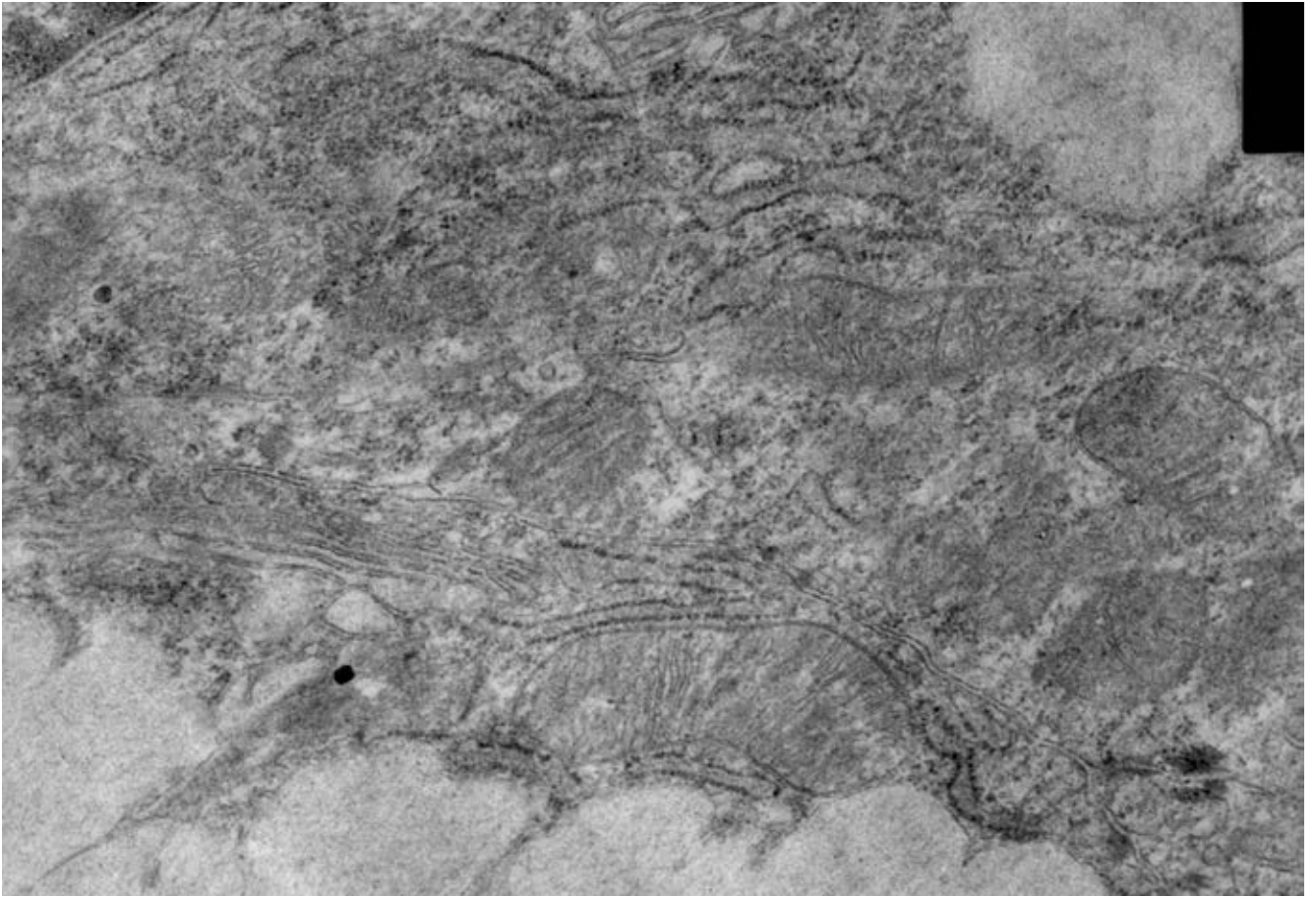


Рисунок 45 – Группа с блокадой р38 MAP-киназного каскада, 3-и сутки.

Начальные признаки деструкции митохондрий в фибробласте.

Электроннограмма. Ув. 17000



Рисунок 46 – Контрольная группа, 3-и сутки.
Сохраненные митохондрии в фибробласте.
Электроннограмма. Ув. 24000



Рисунок 47 – Группа с блокадой p38 MAP-киназного каскада, 7-е сутки.

Фибробласт в области формирования рубца, набухание крист,
деструкция митохондрий. Электронограмма. Ув. 6900

Таким образом, изучение ультраструктуры фибробластов показало значительное влияние ингибитора p38 MAPK на функциональную активность клеток фибробластического ряда, что выражалось в снижении активности фибробластов и запуске митохондриального апоптоза клеток фибробластического ряда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рубцы на коже возникают при глубоком повреждении дермы, которое возникло в результате травмы или хирургического вмешательства.

Травматическое повреждение почти неизбежно сопровождается инфицированием и нередко потерей тканей с возникновением дефекта. В этих условиях главной задачей для организма становится борьба с патогенной микрофлорой и по возможности – скорейшее формирование нарушенного барьера, отделяющего его от внешней среды, с целью защиты жизни. Качество образующегося при этом рубца отходит на второй план.

Между тем, плановые хирургические вмешательства выполняются с соблюдением принципов асептики и антисептики и сопровождаются низким уровнем инфицированности раны. Заживление хирургической раны протекает в гораздо более благоприятных условиях, однако мы по-прежнему в малой степени контролируем процесс формирования рубца и его качество.

В практике пластического хирурга проблема образования рубцов имеет особое значение. Особенно после операций, выполненных по эстетическим показаниям, пациенты часто оценивают результат операции по качеству послеоперационного рубца на коже. Некачественный рубец может стать большой психоэмоциональной проблемой для пациента и может служить основанием для судебных разбирательств.

Лечение некачественного рубца в настоящее время представляет сложную задачу, так как в нашем арсенале ещё нет средств, гарантировано оказывающих положительный эффект [21, 38, 53, 111, 135, 137, 144].

Открытие митогенактивированных протеинкиназ позволяет по-новому подойти к возможности управления процессом заживления послеоперационной раны в пластической хирургии.

Каскадные реакции фосфорилирования протеинкиназ, в результате которых происходит передача полученного сигнала внутрь ядра клетки с последующей

активацией или, наоборот, подавлением активности соответствующих генов, возникают на самых ранних этапах после ранения.

От того, какая информация попадёт в ядро клетки, во многом будет зависеть её ответ на повреждение организма. Деление и дифференциация клеток, продукция ими факторов роста и цитокинов, а также построение внеклеточного матрикса в большой степени регулируются через сигнальные каскады MAP-киназ. Программирование желаемого клеточного ответа в ответ на повреждение тканей организма вместо лечения уже возникшего некачественного рубца является очень перспективным направлением.

Целью нашего исследования стало изучение возможности управления процессом образования послеоперационного рубца путём снижения активности митогенактивируемой протеинкиназы группы p38.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. На модели хирургической кожно-мышечной раны в условиях эксперимента исследовать закономерности процесса заживления раны при искусственном снижении активности p38 MAPK.
2. В условиях асептической кожно-мышечной раны при искусственном снижении активности p38 MAPK изучить экспрессию маркеров дифференцировки клеток фибробластического ряда и синтетическую активность фибробластов.
3. Определить механические свойства образующегося послеоперационного рубца при уменьшении активности p38 MAPK-каскада.
4. Разработать метод формирования послеоперационного рубца с заданными характеристиками посредством изменения активности p38 MAPK.

Материалом для построения теории, формирования заключений и выводов явилось моделирование кожно-мышечной раны у 63 самцов крыс линии Wistar. На этой модели изучено влияние блокатора p38 MAP-киназы SB 203580 на формирование послеоперационного рубца на месте хирургической раны. Причём введение в рану SB 203580 осуществлялось в составе лекарственной плёнки с медленным высвобождением действующего вещества.

Как известно, у высших млекопитающих практически любая рана заживает с образованием рубца, хотя на ранних стадиях развития плода заживление раны может происходить путём регенерации тканей, и рубец не образуется [159]. Полную регенерацию можно наблюдать у низших позвоночных, например, у саламандры.

А. Вауат и соавторы (2003) предполагают, что эта способность была утрачена в процессе эволюции взамен на более быстрый процесс заживления раны в условиях её загрязнения и инфицирования [57]. Быстро развивающийся процесс воспаления, цитокины и каскадные реакции воспаления, перекрывающие друг друга, сделали возможным скорейшее очищение раны от инфекции и её закрытие. Таким образом, образование рубца можно считать платой за возможность выжить в процессе эволюции.

Сделано большое количество попыток добиться заживления раны с образованием как можно более тонкого рубца, который бы не приводил к функциональным нарушениям и не служил источником психоэмоциональных проблем для пациента [5, 6, 17, 19, 29].

Эти попытки начинаются с правильного выбора тактики лечения и адекватной хирургической техники [5, 16, 19, 116] и заканчиваются многочисленными методами лечения рубца. В настоящее время они включают использование мазей [179], витамина D [186], инъекций внутрь рубца глюкокортикоидов [155], блеомицина [41] или инсулина [125], использование шин, давящих повязок, белья и силиконовых наклеек [96], лечение рубца холодом [101], кислородом [83] или облучением при помощи лазеров [89].

Однако пока не создано препаратов для клинического применения, которые давали бы устойчивые результаты в управлении заживлением ран.

Как правило, все попытки являются лечением уже возникших проблем, и время для другого пути репарации оказывается утерянным.

Возможно, поэтому эффективность методов профилактики возникновения грубых рубцов остаётся невысокой [21, 38, 53, 60, 74, 111, 135, 137, 148, 158].

При обзоре литературы, посвящённой методам предотвращения образования грубых рубцов у человека, выполненным методом мета-анализа, J. L. Perez и R. J. Rohrich (2017) выявили, что в настоящее время нет твёрдых доказательств того, что для предотвращения образования грубых рубцов имеют значение такие широко используемые методы, как использование кератинового геля, силиконовых пластин и наклеек *steristrip* для лечения нормальных рубцов [144]. В то же время применение цианакрилатного клея и облучение рубца неразрушающими фракционными лазерами у пациентов с 4-м типом кожи по Фитцпатрику статистически значимо уменьшают возможность образования келоидных и гипертрофических рубцов. Для профилактики образования грубых рубцов после абдоминопластики эффективным оказывается применение специальной повязки, уменьшающей натяжения на края раны. Авторы пришли к заключению, что для профилактики возникновения патологических рубцов имеют значение такие факторы, как натяжение на рубец, его анатомическая локализация и тип кожи по Фитцпатрику. Поэтому авторы посчитали, что профилактика образования грубых рубцов должна строиться с учётом этих факторов, и предложили свой алгоритм действий [144].

Нами применён принципиально новый подход к формированию послеоперационного рубца, основанный на управлении внутриклеточными сигнальными каскадами, с хорошими косметическими свойствами.

Мы уверены в том, что прогресс в лечении ран будет следствием накопления и обобщения знаний о механизмах воспаления и образования соединительной ткани.

МАР-киназные сигнальные пути являются универсальным механизмом, который совершенствовался и сохранился в ходе эволюции, и их исследование приведёт к прорывным открытиям во многих сферах медицины и в управлении процессами заживления ран в частности.

Нами установлено, что снижение активности p38 МАР-киназного сигнального каскада специфическим ингибитором SB 203580 сразу после нанесения хирургической раны в значительной степени изменяет воспалительный

процесс, оказывая действие на различные его фазы. При этом снижается выраженность нейтрофильной инфильтрации, подавляется выраженность фибробластической фазы воспаления, что в итоге приводит к формированию статистически значимо более узкого послеоперационного рубца, по сравнению с группой контроля. Так, у животных основной группы на 30-е сутки ширина сформированного рубца составляла 157,8 [120,11–206,45] мкм, в то время как у животных контрольной группы – 763,47 [334,1–1285,31] мкм ($p = 0,00001$).

Местное действие специфического блокатора p38 MAP-киназ SB 203580 с 3-х по 30-е сутки наблюдения приводило к значительному снижению активности фибробластов и интенсивности коллагенообразования в зоне формирующегося рубца – отмечалось статистически значимое уменьшение содержания коллагена, в сравнении с группой контроля.

Иммуноморфологическими методами исследования доказано, что локальное использование блокатора p38 MAP-киназ в зоне образования послеоперационного рубца, снижает привлечение в зону повреждения прогениторных клеток фибробластического ряда, повышает фибробластическую активность и приводит к повышению экспрессии эндоглина на поверхности фибробластов.

При этом механические свойства образующегося рубца (точка перехода упругой деформации в пластическую деформацию и уровень нагрузки, который приводит к разрыву образца) на 30-е сутки после операции сильнее приближаются к показателям интактной кожи, чем группе контрольных животных.

Таким образом, в нашем исследовании показано, что путём блокады p38 MAP-киназы возможно добиться заживления кожно-мышечной раны с образованием более тонкого рубца без увеличения сроков заживления раны [1, 15, 130].

В то же время нами показано, что эндогенная стимуляция p38 MAPK, выявленная при подавлении активности JNK-каскада, ведёт к ускоренному образованию соединительной ткани в зоне послеоперационного хирургического рубца [30, 50].

Следовательно, экспериментально доказана возможность управления ростом соединительной ткани при воздействии на MAP-киназные каскады с целью получения рубцов с заданной жёсткостью. Это открывает серьёзные перспективы для использования в практике.

Нашими коллегами показано, что снижение активности p38 MAP-киназного каскада под действием блокатора p38 MAP-киназы SB 203580 уменьшает интенсивность спайкообразования в брюшной полости при травме брюшины [33. 162].

Таким образом, нами продемонстрирована практическая возможность воздействия на процессы, сопровождающиеся избыточным образованием соединительной ткани. Это открывает серьёзные перспективы в разработке лекарственных препаратов для лечения таких нарушений стромально-паренхиматозных отношений.

Отработанные при осуществлении программы исследований методические подходы продемонстрировали эффективность в достижении результата и могут быть использованы при разработке лекарственных средств при других патологических процессах.

В пластической хирургии, кроме проблемы заживления покровных тканей, есть и другие, которые приводят к патологическим состояниям. Одной из таких проблем является контрактура груди, возникающая после эндопротезирования груди, которая является наиболее частым осложнением операции и главной причиной её повторного выполнения [93, 103, 150, 160, 164].

Заживление кожно-мышечной раны после субпекторального увеличения груди, содержащей силиконовый имплантат, в сроки наблюдения от 3 до 7 лет приводит к образованию рубца, сдавливающего и деформирующего имплантат от 2 до 15 % случаев при первичной операции и от 5 до 22 % случаев, если эндопротезирование груди производится повторно [108, 181, 182, 183, 184, 185, 188].

К причинам, способствующим развитию контрактуры груди, относят маловирулентную флору [133, 172, 173] и качество оболочки имплантата [55, 56].

Механизм образования рубцовой контрактуры груди между тем остаётся неизвестным. Тем не менее, суть его становится понятной – это воспалительная реакция на инородное тело, которая сопровождается большей нейтрофильной инфильтрацией, усиленным синтезом воспалительных цитокинов, интерлейкина-6, -8 и -17, повышенным уровнем трансформирующего фактора роста β (TGF- β). Она характеризуется повышенной активностью фибробластов, избыточным синтезом коллагена и усиленной активностью миофибробластов, главным образом в среднем слое капсулы, а также усиленным ангиогенезом [94. 176].

В настоящее время существует практически только один способ лечения контрактуры груди – хирургический, – который предусматривает иссечение патологической капсулы и замену имплантата. К сожалению, эффективность его невелика, и повторная контрактура возникает более чем в два раза чаще, чем при первичном эндопротезировании груди.

Мы считаем, что это является следствием того, что в операционной мы боремся с уже наступившим осложнением, вместо того, чтобы предотвратить его.

В ряде исследований в эксперименте показано, что блокирование отдельных этапов процесса воспаления позволяет сделать капсулу более тонкой.

Так S. Y. Jang и соавторы показали, что синтетический метаболит триптофана (Tranilast) уменьшает образование капсулы вокруг неё и препятствует образованию контрактуры [146]. У опытной группы животных снижался синтез коллагена 1-го и 3-го типов, коллагеновые волокна были тоньше, менее плотными и более организованными, чем у животных в контрольной группе, а также происходило уменьшение экспрессии гена TGF- β .

Ещё более интересным нам представляется исследование B. A. Frenkiel и соавторов, в котором препарат Follistatin вводили местно в ложе оболочки имплантата [94]. Фоллистатин – это белок, встречающийся в природе, который необратимо связывается с активинами A и B, что приводит к лизосомальной деградации этих белков и снижению активности TGF- β .

Авторам удалось показать, что однократная подкожная инъекция этого препарата вокруг имплантата во время введения последнего приводила к уменьшению нейтрофильной инфильтрации и значительному снижению синтеза коллагена через 14 дней (38 %) и через 3 месяца (34 %) после введения имплантата, что приводило к существенному снижению толщины капсулы вокруг оболочки имплантата.

Мы согласны с мнением авторов, что если мы сможем контролировать воспаление и процесс образования рубца, то качество капсулы вокруг имплантатов можно улучшить с соответствующим улучшением хирургических результатов.

Проведённое исследование показало, что существуют хорошие перспективы улучшения качества послеоперационного рубца. Они заключаются в использовании достижений молекулярной медицины – создании новых материалов (лекарственных плёнок, шовного материала, эндопротезов) с заданными свойствами – с включением в состав данных материалов блокаторов p38 MAPK.

Данные нашего исследования показывают, что блокатор p38 MAP-киназ SB 203580, который мы помещали внутрь полимерной рассасывающейся плёнки, приводит к неосложнённому заживлению кожно-мышечной раны с образованием статистически значимо более тонкого рубца, чем в контрольных опытах. Это наводит на мысль о том, что возможно создание подобной полимерной рассасывающейся плёнки, покрывающей, например, силиконовые имплантаты для эндопротезирования груди, ягодиц и голеней. Подобные исследования в будущем могут иметь очень большое практическое значение для профилактики образования послеоперационных контрактур после различных видов эндопротезирования.

ВЫВОДЫ

1. Блокада p38 MAP-киназного сигнального каскада в начальном периоде заживления хирургической раны в значительной степени изменяет процесс воспаления и регенерации – снижает выраженность нейтрофильной инфильтрации, подавляется интенсивность фибробластической фазы воспаления.

2. Местное использование блокатора p38 MAPK SB 203580 уменьшает привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону хирургической раны, повышает фиброкластическую активность и статистически значимо снижает интенсивность коллагенообразования в зоне послеоперационного рубца с 3-х по 30-е сутки наблюдения.

3. Введение в рану блокатора p38 повышает прочностные характеристики формирующегося рубца – на 30-е сутки предел прочности статистически значимо превышает показатели контрольной группы – 9130 ± 341 против 7872 ± 237 кПа ($p < 0,05$).

4. Разработанный способ локального подавления p38 MAPK приводит к формированию статистически значимо более узкого послеоперационного рубца по сравнению с группой контроля $157,8 [120,11-206,45]$ мкм против $763,47 [334,1-1285,31]$ мкм ($p = 0,00001$)) при сохранении прочностных характеристик рубца.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Создание новых материалов (лекарственных плёнок, шовного материала), эндопротезов с включением в их состав блокаторов p38 MAPK может способствовать улучшению косметического результата в пластической и реконструктивной хирургии за счёт контроля над процессом воспаления и влияния на качественный состав образующегося послеоперационного рубца.

2. Полимерная рассасывающаяся плёнка, имеющая в своём составе блокатор p38 MAP-киназ SB 203580, может быть использована в качестве покрытия силиконовых имплантатов для эндопротезирования груди, ягодиц и голеней, что будет способствовать неосложнённому заживлению кожно-мышечной раны с образованием достоверно более тонкого рубца.

3. Использование блокаторов p38 MAPK в перспективе может иметь очень большое практическое значение для профилактики образования послеоперационных контрактур после различных видов эндопротезирования.

4. Разработанная методика хирургической кожно-мышечной раны может быть использована для изучения влияния различных местных факторов для получения более качественного результата в пластической хирургии при выполнении контурной пластики тела и аугментации груди при помощи имплантатов.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

CD	– маркер клеточной поверхности (англ. <i>cluster designation</i>)
c-Jun	– белок и ген, ответственный за транскрипцию
ERK	– киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (англ. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
IC ₅₀	– половина максимальной ингибирующей концентрации
IL	– интерлейкин (англ. <i>interleukin</i>)
JNK	– киназа N-концевой части фактора транскрипции Jun (англ. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
МАРК	– митогенактивируемая протеинкиназа, МАР-киназа (англ. <i>mitogen activated protein kinase</i>)
p38	– класс митоген-активируемых протеинкиназ
TNF	– фактор некроза опухоли
VEGF	– вазоэндотелиальный фактор роста (англ. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активность МАР-киназных систем при репаративном процессе: оценка с использованием лазерной конфокальной микроскопии / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина, Г. Б. Гранина и др. // Изв. РАН. Сер. физическая. – 2016. – Т. 80, № 1. – С. 19–21.
2. Ангиогенез как адаптивный механизм при ишемии / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина, Н. Н. Дремина, О. В. Каня // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 5 (93). – С. 192–195.
3. Атауллаханов, Ф. И. Каскады ферментативных реакций и их роль в биологии / Ф. И. Атауллаханов // Соросовский образовательный журнал. – Т. 6, № 7. – 2000. – С. 2–10.
4. Белоусов, А. Е. Пластическая реконструктивная и эстетическая хирургия / А. Е. Белоусов. – СПб. : Гиппократ, 1998. – 744 с.
5. Белоусов, А. Е. Рубцы и их коррекция. Очерки пластической хирургии. Т. 1 / А. Е. Белоусов. – СПб. : Командор SPB, 2005. – 126 с.
6. Болховитинова, Л. Г. Келоидные рубцы / Л. Г. Болховитинова, М. Н. Павлова. – М. : Медицина, 1977. – 136 с.
7. Буянов, В. М. Хирургический шов / В. М. Буянов, В. Н. Егиев, О. А. Удотов. – М., 1993. – 100 с.
8. Вербо, Е. В. Возможности применения ревааскуляризованных аутоотрансплантатов при пластическом устранении комбинированных дефектов лица : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.00.21 / Вербо Елена Викторовна. – М., 2005. – 48 с.
9. Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани / И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, Н. В. Зеленин, Н. И. Аюшинова // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – № 16 (4). – С. 75–86.
10. Волкова, О. В. Основы гистологии с гистологической техникой / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – М. : Медицина, 1982. – 302 с.

11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
12. Гончарова, Е. А. Косметическая коррекция посттравматических и послеоперационных рубцов методом лазерной шлифовки / Е. А. Гончарова, А. М. Толстомятов, Н. И. Фристалъ // Травма. – 2001. – № 2. – С. 216–218.
13. Зеленин, В. Н. Замещение дефектов тканей лоскутами с осевым кровотоком. Непосредственные и отдаленные результаты лечения : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.00.27 / Зеленин Вадим Николаевич. – Иркутск, 2004. – 42 с.
14. Золтан, Я. *Cicatrix optima*. Операционная техника и условия оптимального заживления ран ; пер. с венгерского / Я. Золтан. – Будапешт : Изд-во Академии наук Венгрии, 1974. – 175 с.
15. Использование блокатора р38 митогенактивируемой протеинкиназы для формирования послеоперационного рубца / И. А. Шурыгина, Н. Е. Мантурова, Н. В. Зеленин и др. // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2014. – № 3. – С. 41–45.
16. Куприн, П. Е. Коррекция келоидных и гипертрофических рубцов и пути их профилактики в пластической хирургии : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.27 / Куприн Павел Евгеньевич. – Великий Новгород, 2003. – 22 с.
17. Курс пластической хирургии: руководство для врачей в 2-х т. Том I. Общие вопросы. Кожа и её поражения. Голова и шея /под ред. К. П. Пшениснова. – Ярославль – Рыбинск : Рыбинский Дом печати, 2010. – 754 с.
18. Лекарственная плёнка пролонгированного действия, способ изготовления и способ её применения : Пат. № 2445074 Рос. Федерация ; МПК А61К 9/00 (2006.01), А61К 47/10 (2006.01), А61К 47/38 (2006.01), А61Р 17/02 (2006.01) / Шурыгин М. Г., Шурыгина И. А. ; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии медицинских наук Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии Сибирского отделения РАМН. – № 2010127029/15 ; заявл. 01.07.2010 ; опубл. 20.03.2012. – Бюл. № 8.
19. Логвинов, С. В. Патологические кожные рубцы / С. В. Логвинов, Е. Г. Арий, В. Ф. Байтингер. – Томск : Печатная мануфактура, 2004. – 140 с.

20. Матриксная металлопротеаза 9 и ремоделирование при инфаркте миокарда / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина, Н. Н. Дремина, О. В. Каня // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 2–1 (90). – С. 138–141.

21. Методы оптимизации лечения и профилактики рубцов / В. И. Шаробаро, О. П. Романец, М. И. Гречишников, А. А. Баева // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2015. – № 9. – С. 85–90.

22. Миланов, Н. О. Эстетические аспекты микрохирургической аутоотрансплантации тканей в реконструктивной хирургии / Н. О. Миланов, Е. И. Трофимов, В. И. Комарова // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической медицины. – 1998. – № 3. – С. 15–23.

23. Миронов, А. А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / А. А. Миронов, Я. Ю. Комиссарчик, В. А. Миронов. – СПб. : Наука, 1994. – 400 с.

24. Неробеев, А. И. Восстановление тканей головы и шеи сложными артериализированными лоскутами / А. И. Неробеев. – М. : Медицина, 1988. – С. 236.

25. Оперативная хирургия / Под общ. ред. И. Литтманна ; 3-е изд. – Будапешт : Изд-во Академии наук Венгрии, 1985. – 1136 с.

26. Основные активаторы ангиогенеза и их применение в кардиологии (обзор литературы) / М. Г. Шурыгин, Н. Н. Дремина, И. А. Шурыгина, И. Н. Мачхин // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – № 6. – С. 199–207.

27. Островерхов, Г. Е. Оперативная хирургия и топографическая анатомия : учебник для студентов медицинских вузов / Г. Е. Островерхов, Ю. М. Бомаш, Д. Н. Лубоцкий. – 5-е изд., испр. – М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2013. – 736 с.

28. Пантелеев, В. С. Стимуляция регенераторных процессов в послеоперационной ране с использованием аллогенного биоматериала и энергии лазерного излучения : автореф. ... дис. канд. мед. наук : 14.00.27 / Пантелеев Владимир Сергеевич. – Уфа, 2002. – 18 с.

29. Перловская, В. В. Рубцовые поражения кожи у детей / В. В. Перловская, В. Н. Стальмахович. – Иркутск : РИО ИГМАПО, 2013. – 136 с.
30. Подавление активности Jnk MAPK в регуляции синтеза коллагена при раневом процессе / Г. Б. Гранина, Н. В. Зеленин, И. А. Шурыгина и др. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 5. – С. 177–179.
31. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста (обзор литературы) / И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, Н. В. Зеленин, Г. Б. Гранина // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2009. – Т. 89, № 6. – С. 36–40.
32. Способ определения относительной площади волокон коллагена в гистологическом препарате : Пат. № 2332665 Рос. Федерация : МПК G01N33/48 (2006.01) / Шурыгин М. Г., Дремина Н. Н., Шурыгина И. А., Мачхин И. Н., Антипина С. Л. ; заявитель и патентообладатель ГУ Науч. центр реконструктивной и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН. – № 2006142273/15 ; заявл. 29.11.2006 ; опубл. 27.08.2008. – Бюл. № 24.
33. Способ профилактики спаечной болезни брюшной полости / И. А. Шурыгина, Н. И. Аюшинова, Е. Е. Чепурных, М. Г. Шурыгин // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 10 (146). – С. 83–87.
34. Тенчурина, Т. Г. Современные подходы в реконструктивно-пластической хирургии при гипертрофических рубцах : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.00.27, 03.00.04 / Тенчурина Татьяна Геннадьевна. – М., 2007. – 25 с.
35. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, Н. И. Аюшинова, О. В. Каня // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 110, № 3. – С. 8–12.
36. Фирсов, А. А. Использование внутрикожного шва при хирургических операциях на тазобедренном суставе и проксимальном отделе бедра у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.27, 14.00.35 / Фирсов Александр Александрович. – Хабаровск, 2005. – 24 с.
37. Фришберг, И. А. Косметические операции на лице / И. А. Фришберг. – М. : Медицина, 1984. – 208 с.

38. Шаробаро, В. И. Комплексное лечение и профилактика рубцов различной этиологии / В. И. Шаробаро, О. П. Романец, А. А. Баева // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. – 2016. – № 1. – С. 129–130.
39. Шурыгин, М. Г. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина // *Сибирский научный медицинский журнал*. – 2010. – Т. 30, № 6. – С. 89–92.
40. A first-in-human phase I study of the oral p38 mapk inhibitor, ralimetinib (ly2228820 dimesylate), in patients with advanced cancer / A. Patnaik, P. Haluska, A. W. Tolcher et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22. – P. 1095–1102. – doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1718.
41. A novel murine model of hypertrophic scarring using subcutaneous infusion of bleomycin / A. M. Cameron, D. H. Adams, J. E. Greenwood et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2014. – Vol. 133 (1). – P. 69–78.
42. A randomized controlled trial of the embrace advanced scar therapy device to reduce incisional scar formation / M. T. Longaker, R. J. Rohrich, L. Greenberg et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2014. – Vol. 134 (3). – P. 536–546.
43. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats / W. Wang, S. Lin, Y. Xiao et al. // *Life Sci.* – 2008. – Vol. 82 (3–4). – P. 190–204. – doi: 10.1016/j.lfs.2007.11.009.
44. Activation of melanocortin receptor 4 with RO27-3225 attenuates neuroinflammation through AMPK/JNK/p38 MAPK pathway after intracerebral hemorrhage in mice / S. Chen, L. Zhao, P. Sherchan et al. // *J. Neuroinflammation*. – 2018. – Vol. 15 (1). – P. 106. – doi: 10.1186/s12974-018-1140-6.
45. Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells / K. A. Radek, E. J. Kovacs, R. L. Gallo et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 295 (1). – P. H174–H184. – doi: 10.1152/ajpheart.00699.2007.

46. Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing / K. A. Radek, A. M. Matthies, A. L. Burns et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 289 (3). – P. H1084–H1090.
47. Acute ethanol intoxication increases the risk of infection following penetrating abdominal trauma / L. M. Gentilello, R. A. Cobean, A. P. Walker et al. // *J. Trauma.* – 1993. – Vol. 34 (5). – P. 669–674.
48. Adamson, R. Role of macrophages in normal wound healing: An overview / R. Adamson // *J Wound Care.* – 2009. – Vol. 18. – P. 349–351.
49. Administration of SB 203580, a p38 MAPK inhibitor, reduced the expression of MMP9, and relieved neurologic severity in the Experimental Autoimmune Neuritis (EAN) in rats / Y. Sun, H. Chen, S. Ma et al. // *Neurochem Res.* – 2015. – Vol. 40 (7). – P. 20. – doi: 10.1007/s11064-015-1608-z.
50. Application of mitogen-activated protein kinase inhibitor SP 600125 for wound healing control / I. A. Shurygina, M. G. Shurygin, G. B. Granina, N. V. Zelenin // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2013. – Vol. 2. – P. 1–6. – doi: <http://dx.doi.org/10.7243/2050-1218-2-9>.
51. Arnold, M. Nutrition and wound healing / M. Arnold, A. Barbul // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2006. – Vol. 117 (7 Suppl.). – P. 42–58.
52. Atiba, A. The effect of aloe vera oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats / A. Atiba, H. Ueno, Y. Uzuka // *J. Vet. Med. Sci.* – 2011. – Vol. 73 (5). – P. 583–589.
53. Atiyeh, B. S. Nonsurgical management of hypertrophic scars: evidence-based therapies, standard practices, and emerging methods / B. S. Atiyeh // *Aesthetic Plast. Surg.* – 2007. – Vol. 31 (5). – P. 468–492.
54. Bancroft, J. D. Theory and practice of histological techniques / J. D. Bancroft, M. Gamble. – Elsevier Health Sciences, 2008. – 725 p.
55. Barr, S. Development, fabrication and evaluation of a novel biomimetic human breast tissue derived breast implant surface / S. Barr, E. W. Hill, A. Bayat // *Acta Biomater.* – 2017. – Vol. 49. – P. 260–271. – doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.052.

56. Barr, S. Functional biocompatibility testing of silicone breast implants and a novel classification system based on surface roughness / S. Barr, E. W. Hill, A. Bayat // *Mech. Behav. Biomed. Mater.* – 2017. – Vol. 75. – P. 75–81. – doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.06.030.
57. Bayat, A. Skin scarring / A. Bayat, D. A. McGrouther, M. W. J. Ferguson // *BMJ*. – 2003. – Vol. 326 (7380). – P. 88–92.
58. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing / M. N. Menke, N. B. Menke, C. H. Boardman, R. F. Diegelmann // *Gynecol. Oncol.* – 2008. – Vol. 111 (2 Suppl.). – P. S87–S91. – doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.052.
59. Biology and biomarkers for wound healing / L. E. Lindley, O. Stojadinovic, I. Pastar, M. Tomic-Canic // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2016. – Vol. 138 (3). – P. 18S.
60. Block, L. Emerging therapies for scar prevention / L. Block, A. Gosain, T. W. King // *Adv. Wound Care.* – 2015. – Vol. 4 (10). – P. 607–614.
61. Bode, A. M. The functional contrariety of JNK / A. M. Bode, Z. Dong // *Mol. Carcinog.* – 2007. – Vol. 46 (8). – P. 591–598.
62. Boo, S. Integrins as modulators of transforming growth factor beta signaling in dermal fibroblasts during skin regeneration after injury / S. Boo, L. Dagnino // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. – 2013. – Vol. 2 (5). – P. 238–246.
63. Boutros, T. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer / T. Boutros, E. Chevet, P. Metrakos // *Pharmacol. Rev.* – 2008. – Vol. 60 (3). – P. 261–310. – doi: 10.1124/pr.107.00106.
64. Broughton 2nd, G. Wound healing: An overview / G. Broughton 2nd, J. E. Janis, C. E. Attinger // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2006. – Vol. 117 (7 Suppl.). – P. 11–32.
65. Buchanan, P. J. Evidence-based medicine: wound closure / P. J. Buchanan, T. A. Kung, P. S. Cederna // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2014. – Vol. 134 (6). – P. 1391–1404. – doi: 10.1097/PRS.0000000000000720.

66. Burkhardt, R. Role of flap tension in primary wound closure of mucoperiosteal flaps: a prospective cohort study / R. Burkhardt, N. P. Lang // Clin. Oral Implants Res. – 2010. – Vol. 21 (1). – P. 50–54. – doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01829.x.
67. Campos, A. C. Assessment and nutritional aspects of wound healing / A. C. Campos, A. K. Groth, A. B. Branco // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2008. – Vol. 11 (3). – P. 281–288. – doi: 10.1097/MCO.0b013e3282fbd35a.
68. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5 / S. Kant, S. Schumacher, M. K. Singh et al. // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281 (46). – P. 35511–35519.
69. Cheng, Y. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction / Y. Cheng, W. H. Prusoff // Biochem. Pharmacol. – 1973. – Vol. 22 (23). – P. 3099–3108.
70. Chithra, P. Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats / P. Chithra, G. B. Sajithlal, G. Chandrakasan // J. Ethnopharmacol. – 1998. – Vol. 59 (3). – P. 195–201.
71. Collagen-binding peptidoglycans inhibit MMP mediated collagen degradation and reduce dermal scarring / K. Stuart, J. Paderi, P. W. Snyder et al. // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6 (7). – P. e22139. – doi: 10.1371/journal.pone.0022139.
72. Comparing conventional gauze therapy to vacuum-assisted closure wound therapy: A prospective randomised trial / C. M. Mouës, G. J. Bemd, F. Heule, S. E. Hovius // Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. – 2007. – Vol. 60. – P. 672–681.
73. Coulombe, P. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions / P. Coulombe, S. Meloche // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – Vol. 1773 (8). – P. 1376–1387.
74. Current therapeutic approach to hypertrophic scars / Z. B. Mokos, A. Jović, L. Grgurević et al. // Front. Med. (Lausanne). – 2017. – Vol. 4. – P. 83. – doi: 10.3389/fmed.2017.00083.

75. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing / N. S. Greaves, K. J. Ashcroft, M. Baguneid, A. Bayat // *J. Dermatol. Sci.* – 2013. – Vol. 72 (3). – P. 206–217.

76. Cutaneous scarring: basic science, current treatments, and future directions / C. D. Marshall, M. S. Hu, T. Leavitt et al. // *Adv. Wound Care* (New Rochelle). – 2018. – Vol. 7 (2). – P. 29–45. – doi: 10.1089/wound.2016.0696.

77. De Boer, W. I. Perspectives for cytokine antagonist therapy in COPD / W. I. De Boer // *Drug Discov. Today*. – 2005. – Vol. 10 (2). – P. 93–106.

78. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring / J. F. Wang, C. Dodd, H. A. Shankowsky et al. // *Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 88 (12). – P. 1278–1290. – doi: 10.1038/labinvest.2008.101.

79. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice / G. Pagès, S. Guérin, D. Grall et al. // *Science*. – 1999. – Vol. 286 (5443). – P. 1374–1377.

80. Delayed topical p38 MAPK inhibition attenuates full-thickness burn wound inflammatory signaling / D. Carter, A. Warsen, K. Mandell et al. // *J. Burn Care. Res.* – 2014. – Vol. 35 (2). – P. 83–92. – doi:10.1097/BCR.0b013e31828a8d6e.

81. Diegelmann, R. F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing / R. F. Diegelmann, M. C. Evans // *Front Biosci.* – 2004. – Vol. 9. – P. 283–289.

82. Doersch, K. M. The contribution of interleukin-2 to effective wound healing / K.M. Doersch, D.J. Dello Stritto, M. K. Newell-Rogers // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2017. – Vol. 242 (4). – P. 384–396. – doi: 10.1177/1535370216675773.

83. Does hyperbaric oxygen therapy work in facilitating acute wound healing: a systematic review / P. B. Dauwe, B. J. Pulikkottil, L. Lavery et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2014. – Vol. 133 (2). – P. 208–215.

84. Dong, S. MicroRNA-22 may promote apoptosis and inhibit the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts by regulating the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase/p21 pathway / S. Dong, Y. Sun // *Exp. Ther. Med.* – 2017. – Vol. 14 (4). – P. 3841–3845. – doi: 10.3892/etm.2017.4942.

85. Dovi, J. V. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice / J. V. Dovi, L. K. He, L. A. DiPietro // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – Vol. 73. – P. 448–455.
86. Edwards, R. Bacteria and wound healing / R. Edwards, K. G. Harding // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 17 (2). – P. 91–96.
87. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats / P. Gál, M. Mokrá, B. Vidinský et al. // *Lasers Med. Sci.* – 2009. – Vol. 24 (4). – P. 539–547. – doi: 10.1007/s10103-008-0604-9.
88. Effect of ibuprofen on the inflammatory response to surgical wounds / Y. L. Dong, R. Y. Fleming, T. Z. Yan et al. // *J. Trauma.* – 1993. – Vol. 35 (3). – P. 340–343.
89. Elsaie, M. L. Lasers for scars: A review and evidence-based appraisal / M. L. Elsaie, S. Choudhary // *J. Drugs Dermatol.* – 2010. – Vol. 9. – P. 1355–1362.
90. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts / M. Guerrero-Esteo, P. Lastres, A. Letamendia et al. // *Eur. J. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 78 (9). – P. 614–623. – doi: 10.1016/S0171-9335(99)80046-6.
91. Energy metabolism of experimental wounds at various oxygen environments. / J. Kivisaari, T. Vihersaari, S. Renvall, J. Niinikoski // *Ann. Surg.* – 1975. – Vol. 181. – P. 823–828.
92. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation / Y. Yao, W. Li, J. Wu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100 (22). – P. 12759–12764.
93. Five-year safety data for more than 55,000 subjects following breast implantation: comparison of rare adverse event rates with silicone implants versus national norms and saline implants / N. Singh, G. J. Picha, B. Hardas et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2017. – Vol. 140 (4). – P. 666–679. – doi: 10.1097/PRS.0000000000003711.
94. Follistatin and the breast implant capsule / B. A. Frenkiel, P. Temple-Smith, D. de Kretser, G. J. Southwick // *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* – 2017. – Vol. 5 (3). – P. e1258. – doi: 10.1097/GOX.0000000000001258.

95. Franz, M. G. Optimizing healing of the acute wound by minimizing complications / M. G. Franz, D. L. Steed, M. C. Robson // *Curr. Probl. Surg.* – 2007. – Vol. 44 (11). – P. 691–763.
96. Fulton, J. E. Silicone gel sheeting for the prevention and management of evolving hypertrophic and keloid scars / J. E. Fulton // *Dermatol. Surg.* – 1995. – Vol. 21. – P. 947–951.
97. Garrington, T. P. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways / T. P. Garrington, G. L. Johnson // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 11 (2). – P. 211–218.
98. Gompelman, M. Update on the role of infection and biofilms in wound healing: pathophysiology and treatment / M. Gompelman, S. A. V. van Asten, E. J. G. Peters // *Plast. Reconst. Surg.* – 2016. – Vol. 138 (3S). – P. 61S–70S.
99. Grabowska, A. I. FOXN1 transcription factor in epithelial growth and wound healing / A. I. Grabowska, T. Wilanowski // *Mol. Cell Biol.* – 2017. – Vol. 37 (17). – P. e00110–e00117. – doi: 10.1128/MCB.00110-17.
100. Guo, S. Factors affecting wound healing / S. Guo, L. A. DiPietro // *J. Dent. Res.* – 2010. – Vol. 89 (3). – P. 219–229.
101. Har-Shai, Y. Intralesional cryotherapy for enhancing the involution of hypertrophic scars and keloids / Y. Har-Shai, M. Amar, E. Sabo // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2003. – Vol. 111 (6). – P. 1841–1852.
102. Hart, C. E. Dermagraft: use in the treatment of chronic wounds / C. E. Hart, A. Loewen-Rodriguez, J. Lessem // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. – 2012. – Vol. 1 (3). – P. 138–141.
103. Hidalgo, D. A. Breast augmentation / D. A. Hidalgo, J. A. Spector // *Plast. Reconst. Surg.* – 2014. – Vol. 133 (4). – P. 567e–583e. – doi: 10.1097/PRS.0000000000000033.
104. Holmström, K. M. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling / K. M. Holmström, T. Finkel // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 15 (6). – P. 411–421. – doi: 10.1038/nrm3801.

105. Human precision-cut liver slices as a model to test antifibrotic drugs in the early onset of liver fibrosis / I. M. Westra, H. A. Mutsaers, T. Luangmonkong et al. // *Toxicol. In Vitro.* – 2016. – Vol. 35. – P. 77–85. – doi: 10.1016/j.tiv.2016.05.012.

106. Identification and analysis of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades in *Fragaria vesca* / H. Zhou, S. Ren, Y. Han et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18 (8). – P. 1766. – doi: 10.3390/ijms18081766.

107. Impaired wound healing / N. B. Menke, K. R. Ward, T. M. Witten et al. // *Clin. Dermatol.* – 2007. – Vol. 25 (1). – P. 19–25. – doi: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.12.005>.

108. Inamed silicone breast implant core study results at 6 years / S. L. Spear, D. K. Murphy, A. Slicton, P. S. Walker // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2007. – Vol. 120 (7). – P. 8S–16S; Discussion 17S–18S.

109. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase / L. Ravanti, J. Heino, C. López-Otín, V. M. Kähäri // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274 (4). – P. 2446–2455.

110. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse / D. Altavilla, A. Saitta, D. Cucinotta et al. // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50 (3). – P. 667–674.

111. International clinical recommendations on scar management / T. A. Mustoe, R. D. Cooter, M. H. Gold et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2002. – Vol. 110 (2). – P. 560–571.

112. Involvement of p38 MAPK in reactive astrogliosis induced by ischemic stroke / R. G. Choudhury, M. G. Ryou, E. Poteet et al. // *Brain Res.* – 2014. – Vol. 1551. – P. 45–58. – doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.013.

113. Ito, R. Influence of MAPK Signaling on ischemic wound healing in the elderly / R. Ito, Q. Zhang // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2014. – March Suppl. – P. 158.

114. Jalali, M. Current use of steroids in management of abnormal raised skin scars / M. Jalali, A. Bayat // *Surgeon.* – 2007. – Vol. 5 (3). – P. 175–180.

115. Janis, J. E. Introduction to “Current Concepts in Wound Healing: Update 2016” / J. E. Janis, C. E. Attinger, L. Lavery // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2016. – Vol. 138 (3S). – P. 7–8. – doi: 10.1097/PRS.0000000000002697.
116. Janis, J. E. Wound healing: Part II. Clinical applications / J. E. Janis, B. Harrison // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2014. – Vol. 133 (3). – P. 383–392.
117. Janis, J. E. Wound healing: Part 1. Basic science / J. E. Janis, B. Harrison // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2016. – Vol. 138 (3 Suppl.). – P. 9S–17S. – doi: 10.1097/PRS.0000000000002773.
118. JNK, p38, ERK, and SGK1 inhibitors in cancer / J. Cicens, E. Zalyte, A. Rimkus et al. // *Cancers (Basel)*. – 2017. – Vol. 10 (1). – P. 1–12.
119. Kavalukas, S. L. Nutrition and wound healing : an update / S. L. Kavalukas, A. Barbul // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2011. – Vol. 127. – P. 38S–43S. – doi: 10.1097/PRS.0b013e318201256c.
120. Kragholm, K. Emerging treatment options to improve cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome: focus on losmapimod / K. Kragholm, L. K. Newby, C. Melloni // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2015. – Vol. 9. – P. 4279–4286. – doi: 10.2147/DDDT.S69546.
121. Kwan, P. O. Biological principles of scar and contracture / P. O. Kwan, E. E. Tredget // *Hand Clin.* – 2017. – Vol. 33 (2). – P. 277–292. – doi: 10.1016/j.hcl.2016.12.004.
122. Kyriakis, J. M. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update / J. M. Kyriakis, J. Avruch // *Physiol. Rev.* – 2012. – Vol. 92 (2). – P. 689–737. – doi: 10.1152/physrev.00028.2011.
123. Kyttaris, V. C. Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs / V. C. Kyttaris // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2012. – Vol. 6. – P. 245–250. – doi: 10.2147/DDDT.S25426.
124. Leibovich S. J. The role of the macrophage in wound repair: A study with hydrocortisone and antimacrophage serum / S. J. Leibovich, R. Ross // *Am. J. Pathol.* – 1975. – Vol. 78. – P. 71–100.

125. Low-dose insulin as an antiscarring therapy in breast surgery: a randomized controlled trial / M.-J. Hallam, E. Pitt, A. Thomas, C. Nduka // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2018. – Vol. 141 (4). – P. 476–485.
126. Macpherson, N. Effect of different suture techniques on tension dispersion in cutaneous wounds: A pilot study / N. Macpherson, S. Lee // *Australas. J. Dermatol.* – 2010. – Vol. 51 (4). – P. 263–267. – doi: 10.1111/j.1440-0960.2010.00691.x.
127. Madecassoside suppresses migration of fibroblasts from keloids: involvement of p38 kinase and PI3K signaling pathways / J. Song, H. Xu, Q. Lu et al. // *Burns.* – 2012. – Vol 38 (5). – P. 677–684. – doi: 10.1016/j.burns.2011.12.017.
128. Martin, P. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly / P. Martin, S. J. Leibovich // *Trends Cell Biol.* – 2005. – Vol. 15. – P. 599–607.
129. Martin, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration / P. Martin // *Science.* – 1997. – Vol. 276 (5309). – P. 75–81. – doi: 10.1126/science.276.5309.75.
130. Mechanisms of connective tissue formation and blocks of mitogen activated protein kinase / I. A. Shurygina, M. G. Shurygin, N. I. Ayushinova et al. // *Front. Chem. Sci. Eng.* – 2012. – Vol. 6, N 2. – P. 232–237. – doi: 10.1007/s11705-012-1286-1.
131. Mechanisms of transforming growth factor beta(1)/Smad signalling mediated by mitogen-activated protein kinase pathways in keloid fibroblasts / S. He, X. Liu, Y. Yang et al. // *Br. J. Dermatol.* – 2010. – Vol. 162 (3). – P. 538–546. – doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09511.x.
132. Meurer, S.K. Usage of mitogen-activated protein kinase small molecule inhibitors: more than just inhibition! / S. K. Meurer, R. Weiskirchen // *Front Pharmacol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 98.
133. Microbial evaluation in capsular contracture of breast implants / M. Galdiero, F. Larocca, M. R. Iovene et al. // *Plast Reconstr Surg.* – 2018. – Vol. 141 (1). – P. 23–30. – doi: 10.1097/PRS.0000000000003915.
134. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions / G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson et al. // *Endocr. Rev.* – 2001. – Vol. 22 (2). – P. 153–183.

135. Mofikoya, B. O. Keloid and hypertrophic scars: a review of recent developments in pathogenesis and management / B. O. Mofikoya, W. L. Adeyemo, A. A. Abdus-salam // *Nig. Q. J. Hosp. Med.* – 2007. – Vol. 17 (4). – P. 134–139.

136. Nelson, K. K. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases / K. K. Nelson, J. A. Melendez // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 37 (6). – P. 768–784.

137. New innovations in scar management / A. D. Widgerow, L. A. Chait, R. Stals, P. J. Stals // *Aesthetic Plast. Surg.* – 2000. – Vol. 24 (3). – P. 227–234.

138. P38 delta MAPK promotes breast cancer progression and lung metastasis by enhancing cell proliferation and cell detachment / M. Wada, D. Canals, M. Adada et al. // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36 (47). – P. 6649–6657. – doi: 10.1038/onc.2017.274.

139. p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart / M. Li, D. Georgakopoulos, G. Lu et al. // *Circulation*. – 2005. – Vol. 111 (19). – P. 2494–2502.

140. P38 MAPK inhibition improves heart function in pressure-loaded right ventricular hypertrophy / B. Kojonazarov, T. Novoyatleva, M. Boehm et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 57 (5). – P. 603–614. – doi: 10.1165/rcmb.2016-0374OC.

141. P38 MAPK is required for tooth morphogenesis and enamel secretion / M. B. Greenblatt, J. M. Kim, H. Oh et al. // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290 (1). – P. 284–295.

142. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression / J. Westermarck, S. P. Li, T. Kallunki et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 21 (7). – P. 2373–2383.

143. Palmitate promotes autophagy and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK / J Liu, F. Chang, F. Li et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 463 (3). – P. 262–267. – doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.042.

144. Perez, J. L. Optimizing postsurgical scars: a systematic review on best practices in preventative scar management / J. L. Perez, R. J. Rohrich // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2017. – Vol. 140 (6). – P. 782–793.
145. Preplanning with protocols for skin and wound care in obese patients / S. Gallagher, C. Langlois, D. W. Spacht et al. // *Adv. Skin Wound Care.* – 2004. – Vol. 17 (8). – P. 436–441.
146. Preventive effect of synthetic tryptophan metabolite on silicone breast implant-induced capsule formation / S. H. Kang, S. Y. Jang, J. H. Ryou et al. // *Ann. Plast. Surg.* – 2018. – Vol. 80 (5). – P. 565–571. – doi: 10.1097/SAP.0000000000001335.
147. Rahimnejad, M. Biomaterials and tissue engineering for scar management in wound care / M. Rahimnejad, S. Derakhshanfar, W. Zhong // *Burns Trauma.* – 2017. Vol. 5. – P. 4. – doi: 10.1186/s41038-017-0069-9.
148. Recent advances in hypertrophic scar / J. Zhang, Y. Li, X. Bai et al. // *Histol. Histopathol.* – 2017. – Vol. 31 (1). – P. 27–39. – doi: 10.14670/HH-11-908.
149. Reinforced tension line suture closure after midline laparotomy in emergency surgery / A. Agarwal, Z. Hossain, A. Agarwal et al. // *Trop. Doct.* – 2011. – Vol. 41 (4). – P. 193–196. – doi: 10.1258/td.2011.110045.
150. Risk factor analysis for capsular contracture: a 5-year Sientra study analysis using round, smooth, and textured implants for breast augmentation / W. G. Stevens, M. Y. Nahabedian, M. B. Calobrace et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2013. – Vol. 132 (5). – P. 1115–1123. – doi: 10.1097/01.prs.0000435317.76381.68.
151. Risk factors for tissue and wound complications in gastrointestinal surgery / L. T. Sørensen, U. Hemmingsen, F. Kallehave et al. // *Ann. Surg.* – 2005. – Vol. 241 (4). – P. 654–658.
152. Rohani, M. G. Matrix remodeling by MMPs during wound repair / M. G. Rohani, W. C. Parks // *Matrix Biol.* – 2015. – Vol. 44–46. – P. 113–121. – doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.002.
153. Rohrich, R. J. The “Current Concepts in Wound Healing: Update 2016” Supplement / R. J. Rohrich // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2016. – Vol. 138 (3S). – P. 1S–2S. – doi: 10.1097/PRS.0000000000002693.

154. Roles of p38 MAPK in the regulation of the inflammatory response to swine influenza virus-induced acute lung injury in mice / D. Wei, Z. H. Huang, R. H. Zhang et al. // *Acta Virologica*. – 2014. – Vol. 58 (4). – P. 374–379.
155. Roques, C. The use of corticosteroids to treat keloids: a review / C. Roques, L. Téot // *Int. J. Low Extrem. Wounds*. – 2008. – Vol. 7 (3). – P. 137–145. – doi: 10.1177/1534734608320786.
156. Rosiglitazone inhibits TGF- β 1 induced activation of human Tenon fibroblasts via p38 signal pathway / Y. H. Luo, P. B. Ouyang, J. Tian et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9 (8). – P. e105796. – doi: 10.1371/journal.pone.0105796.
157. Ross, R. Wound healing and collagen formation. I. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope / R. Ross, E. P. Benditt // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1961. – Vol. 11. – P. 677–700.
158. Sanative wound healing product does not accelerate reepithelialization in a mouse cutaneous wound healing model / C. D. Marshall, M. S. Hu, T. Leavitt et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2017. – Vol. 139 (2). – P. 343–352.
159. Scarless wound healing: chasing the holy grail / G. G. Walmsley, Z. N. Maan, V. W. Wong et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2015. – Vol. 135. – P. 907–917.
160. Schwartz, M. R. Evidence-based medicine: breast augmentation / M. R. Schwartz // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2017. – Vol. 140 (1). – P. 109e–119e. – doi: 10.1097/PRS.00000000000003478.
161. Shepherd, A. A. Nutrition for optimum wound healing / A. A. Shepherd // *Nurs. Stand.* – 2003. – Vol. 18 (6). – P. 55–58.
162. Shurygin, M. G. Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process / M. G. Shurygin, I. A. Shurygina // *WO2012156938*. – 2012. – Nov. 22.
163. Singer, A. J. Cutaneous wound healing / A. J. Singer, R. A. Clark // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 341. – P. 738–746. – doi: 10.1056/NEJM199909023411006.
164. Somogyi, R. B. Outcomes in primary breast augmentation: a single surgeon's review of 1539 consecutive cases / R. B. Somogyi, M. H. Brown // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2015. – Vol. 135 (1). – P. 87–97. – doi: 10.1097/PRS.0000000000000773

165. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors / S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 351 (Pt 1). – P. 95–105.

166. Stem cell-based therapeutics to improve wound healing / M. S. Hu, T. T. Leavitt, S. Malhotra et al. // *Plast. Surg. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – Article ID 383581. – P. 7. – doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/383581>.

167. Stem cells for cutaneous wound healing / G. T. Kirby, S. J. Mills, A. J. Cowin et al. // *BioMed Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015, Article ID 285869. – P. 11. – doi: [10.1155/2015/285869](http://dx.doi.org/10.1155/2015/285869).

168. Szabo, G. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense / G. Szabo, P. Mandrekar // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2009. – Vol. 33 (2). – P. 220–232. – doi: [10.1111/j.1530-0277.2008.00842.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00842.x).

169. Tan, J. Current progress in understanding the molecular pathogenesis of burn scar contracture / J. Tan, J. Wu // *Burns Trauma.* – 2017. – Vol. 5. – P. 14. – doi: [10.1186/s41038-017-0080-1](http://dx.doi.org/10.1186/s41038-017-0080-1).

170. TGF- β 1, in association with the increased expression of connective tissue growth factor, induce the hypertrophy of the ligamentum flavum through the p38 MAPK pathway / Y. L. Cao, Y. Duan, L. X. Zhu et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2016. – Vol. 38 (2). – P. 391–398. – doi: [10.3892/ijmm.2016.2631](http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2016.2631).

171. Thalidomide inhibits fibronectin production in TGF- β 1-treated normal and keloid fibroblasts via inhibition of the p38/Smad3 pathway / C. J. Liang, Y. H. Yen, L. Y. Hung et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 85 (11). – P. 1594–1602. – doi: [10.1016/j.bcp.2013.02.038](http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.038).

172. The aetiopathogenesis of capsular contracture: A systematic review of the literature / Y. Bachour, S. P. Verweij, S. Gibbs et al. // *Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* – 2018. – Vol. 71 (3). – P. 307–317. – doi: [10.1016/j.bjps.2017.12.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2017.12.002).

173. The effect of late infection and antibiotic treatment on capsular contracture in silicone breast implants: A rat model / K. E. Miller, B. Hontanilla, A. Cabello et al. // *Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* – 2016. – Vol. 69 (1). – P. 70–76. – doi: [10.1016/j.bjps.2015.08.027](http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2015.08.027).

174. The effect of p38 MAPK on cyclic stretch in human facial hypertrophic scar fibroblast differentiation / Q. C. Du, D. Z. Zhang, X. J. Chen et al. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (1). – P. e75635. – doi: 10.1371/journal.pone.0075635.

175. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats / G. D. Krischak, P. Augat, L. Claes et al. // J. Wound Care. – 2007. – Vol. 16 (2). – P. 76–78.

176. The role of angiogenesis, inflammation and estrogen receptors in breast implant capsules development and remodeling / F. Segreto, S. Carotti, G. F. Marangi et al. // Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. – 2018. – Vol. 71 (5). – P. 637–643. – doi: 10.1016/j.bjps.2017.12.003.

177. The role of stem cell therapeutics in wound healing: current understanding and future directions / S. Sorice, K. C. Rustad, A.Y. Li, G. C. Gurtner // Plast. Reconstr. Surg. – 2016. – Vol. 138 (3 Suppl.). – P. 31–41.

178. Thomson, P. D. Immunology, microbiology, and the recalcitrant wound / P. D. Thomson // Ostomy Wound Manage. – 2000. – Vol. 46 (1A Suppl.). – P. 77S–82S.

179. Topical application of omega-3-, omega-6-, and omega-9-rich oil emulsions for cutaneous wound healing in rats / W. M. W. Ishak, H. Katas, N. P. Yuen et al. // Drug Deliv. Transl. Res. – 2018. – Vol. 17. – P. 1–16. – doi: 10.1007/s13346-018-0522-8.

180. Transforming growth factor- β 1 induces fibrosis in rat meningeal mesothelial cells via the p38 signaling pathway / X. J. Yue, Y. Guo, H. J. Yang et al. // Mol. Med. Rep. – 2016. – Vol. 14 (2). – P. 1709–1713. – doi: 10.3892/mmr.2016.5411.

181. U.S. Food and Drug Administration. Summary of safety and effectiveness data: Inamed silicone-filled implants [Электронный ресурс]. – 2006. – Режим доступа: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf2/P020056b.pdf (дата обращения 22.01.2018).

182. U.S. Food and Drug Administration. Summary of safety and effectiveness data: Mentor MemoryGel silicone gel-filled breast implants [Электронный ресурс]. – 2006. – Режим доступа: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf3/p030053b.pdf (дата обращения 22.01.2018).

183. U.S. Food and Drug Administration. Summary of safety and effectiveness data: MemoryShape breast implants [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf6/P060028b.pdf (дата обращения 22.01.2018).

184. U.S. Food and Drug Administration. Summary of safety and effectiveness data: Natrelle 410 highly cohesive anatomically shaped silicone-filled breast implants [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf4/P040046b.pdf (дата обращения 22.01.2018).

185. U.S. Food and Drug Administration. Summary of safety and effectiveness data: Sientra silicone gel breast implants [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/p070004b.pdf (дата обращения 22.01.2018).

186. Vitamin D and inflammatory biomarkers during wound-healing / I. Correia-Sá, P. Serrão, M. Marques, M. A. Vieira-Coelho // Plastic Surgery. – 2014. – Vol. 134 (4S-1). – P. 68–69.

187. Waetzig, V. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage / V. Waetzig, T. Herdegen // Trends Pharmacol. Sci. – 2005. – Vol. 26 (9). – P. 455–461.

188. Wan, D. Revisiting the management of capsular contracture in breast augmentation: a systematic review / D. Wan, R. J. Rohrich // Plast. Reconstr. Surg. – 2016. – Vol. 137 (3). – P. 826–841. – doi: 10.1097/01.prs.0000480095.23356.ae.

189. Werner, S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // Physiol. Rev. – 2003. – Vol. 83 (3). – P. 835–870.

190. Whitney, J. D. Overview: acute and chronic wounds / J. D. Whitney // Nurs. Clin. North Am. – 2005. – Vol. 40 (2). – P. 191–205.

191. Wilson, J. A. Obesity: impediment to postsurgical wound to postsurgical wound healing / J. A. Wilson, J. J. Clark // Adv. Skin Wound Care. – 2004. – Vol. 17 (8). – P. 426–435.

192. Wilson, J. A. Obesity: impediment to wound healing / J. A. Wilson, J. J. Clark // Crit. Care Nurs Q. – 2003. – Vol. 26 (2). – P. 119–132.

193. Witte, M. B. General principles of wound healing / M. B. Witte, A. Barbul // Surg Clin North Am. – 1997. – Vol. 77. – P. 509–528.
194. Wound healing / P. H. Wang, B. S. Huang, H. S. Horng et al. // J. Chin. Med. Assoc. – 2018. – Vol. 81 (2). – P. 94–101. – doi: 10.1016/j.jcma.2017.11.002.
195. Wound repair and regeneration / G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. T. Longaker // Nature. – 2008. – Vol. 453 (7193). – P. 314–321. – doi: 10.1038/nature07039.
196. Wu, T. Plastic surgery made easy. Simple techniques for closing skin defects and improving cosmetic results / T. Wu // Reprinted from Australian Family Physician. – 2006. – Vol. 35 (7). – P. 492–496.
197. Xia, W. p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta2 transcription in human keloid fibroblasts / W. Xia, M. T. Longaker, G. P. Yang // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – Vol. 290 (3). – P. R501–R508.